



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA APLICADA
CIBA-IPN TLAXCALA**

**EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE
CEPAS DE *Lactobacillus* PARA SU USO EN
UN ALIMENTO FUNCIONAL**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN TECNOLOGÍA AVANZADA

**PRESENTA:
ARIANA HERNÁNDEZ RAMÍREZ**

DIRECTORES DE TESIS:
Dra. MÓNICA ROSALES PÉREZ
Dr. SERGIO RUBÉN TREJO ESTRADA

Tepetitla de Lardizábal, Tlaxcala Junio 2009



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal, Tlax. siendo las 12:00 horas del día 01 del mes de

JUNIO del 2009 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIBA TLAXCALA para examinar la tesis de grado titulada:

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE *Lactobacillus* PARA SU USO EN UN ALIMENTO FUNCIONAL

Presentada por el alumno:

Hernández
Apellido paterno

Ramírez
materno

Ariana
nombre(s)

Con registro:

B	0	6	1	0	6	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de:

Maestro en Tecnología Avanzada

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA

Directora de Tesis
Dra. Monica Rosales Pérez



Director de Tesis
Dr. Sergio R. Trejo Estrada

Dra. María del Carmen Cruz López

Dr. Víctor Eric López y López

M.C. Carlos Pérez Medrano

EL PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dra. Alma Leticia Martínez Ayala



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Tepetitla de Lardizabal Tlaxcala el día 4 del mes Junio del año 2009, el (la) que suscribe Ariana Hernández Ramírez alumno (a) del Programa de Maestría en Tecnología Avanzada con número de registro B061063, adscrito a CIBA-TLAXCALA, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Mónica Rosales Pérez y Dr. Sergio Rubén Trejo Estrada y cede los derechos del trabajo intitulado Evaluación del Potencial Probiótico de Cepas de *Lactobacillus* para su uso en un alimento funcional, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección anairahera@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Ariana Hernández Ramírez

Nombre y firma

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mis padres; **José Leonardo Hernández Loaiza e Imelda Ramírez Meléndez**, por el apoyo, sacrificio y afecto incondicional que me han mostraron a lo largo de mi vida.

A mis hermanos; **Luis Jesús y José Iván**, que siempre me han acompañado en los momentos de unión y felicidad.

A mi esposo; **Rubén Isaac**, por su compañía incondicional mostrada en este trayecto.

A mi suegra; **Carmen Herrera** por su apoyo mostrado en este camino.

A mis directores; la Dra. **Mónica Rosales Pérez** y al Dr. **Sergio Rubén Trejo Estrada** por su gran enseñanza y por la oportunidad de seguir adelante con mis metas.

A mis **asesores y profesores**; por sus enriquecedoras orientaciones que me transmitieron a lo largo de este trayecto.

Al **instituto Politécnico Nacional** y a **PIFI**; por el apoyo con la beca Institucional y PIFI respectivamente.

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y UNIDADES	vi
GLOSARIO DE TÉRMINOS	vii
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Alimentos Funcionales	3
2.2 Probióticos.....	5
2.2.1 Propiedades de los Probióticos	5
2.2.2 Bioseguridad.....	6
2.2.3 Resistencia a los ácidos y sales biliares.....	6
2.2.4 Capacidad antimicrobiana de cepas probióticas	7
2.2.5 Actividad β -Galactosidasa	7
2.2.6 Adherencia a las células intestinales y colonización del intestino	7
2.2.7 Estimulación del sistema inmune	9
2.2.8 Viabilidad de organismos probióticos.....	10
2.3 Efectos benéficos de los probióticos.....	11
2.4 Administración y consumo de probióticos.....	12
3. Bacterias Ácido Lácticas	14
3.1 Taxonomía.....	14
3.2 Metabolismo de BAL.....	14
3.3 Rutas principales de fermentación	15
4.1 Clasificación	18
4.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas	19
4.3 Bacteriocinas producidas por especies de <i>Lactobacillus</i>	21
4.4 Aplicación de Bacteriocinas de <i>Lactobacillus</i> en la bioconservación de alimentos.....	21
5. Género <i>Lactobacillus</i>	23
5.1 Fuentes de aislamiento de Lactobacilos	23
5.2 Aguamiel.....	24
5.3 Obtención y conservación de cepas de Lactobacilos	25

5.4 Crecimiento de <i>Lactobacilos</i>	26
5.5 Medios de cultivo para el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas de <i>Lactobacillus</i>	27
6. JUSTIFICACIÓN	29
7. OBJETIVO GENERAL	30
7.1 Objetivos específicos.....	30
8. MATERIALES Y MÉTODOS	31
8.1. Material biológico	31
8.2 Conservación y propagación de cepas.	31
8.3 Condiciones de cultivo para la determinación de viabilidad de las cepas....	32
8.4 Selección y Evaluación de Medios de cultivo.....	32
8.5 Determinación de peso seco (biomasa).....	34
8.6 Evaluación de la Capacidad antimicrobiana del sobrenadante y el cultivo.	34
8.7 Adherencia a cultivos celulares	35
8.8 Determinación del ácido láctico por el método de acidez titulable.	35
8.9. Determinación de glucosa y ácido láctico por el analizador bioquímico	36
8.9.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)	36
8.9.2 Análisis estadístico	36
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
9.1 Evaluación del efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad de las cepas de <i>Lactobacillus</i>	37
9.2 Selección de Medios de cultivo para el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas de <i>Lactobacillus</i>	39
9.3 Comparación del crecimiento de <i>Lactobacillus</i> en los medios utilizados (Viabilidad y biomasa).....	43
9.4 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las cuatro cepas de <i>Lactobacillus</i>	46
9.5 Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de <i>Lactobacillus</i> a la línea celular HeLa	51
9.6 Cinética de crecimiento de la cepa 22 en el medio MSB	61
10. CONCLUSIONES	67
11. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS	69
12. REFERENCIAS	70
13. ANEXOS	94

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos y beneficios esperados de los Alimentos Funcionales....	4
Tabla 2. Microorganismos probióticos y su estatus de seguridad.....	6
Tabla 3. Efectos y beneficios reportados de los probióticos.....	12
Tabla 4. Clases de Bacteriocinas producidas por LAB.....	19
Tabla 5. Bacteriocinas producidas por especies <i>Lactobacillus</i> y su actividad contra patógenos.....	21
Tabla 6. Aplicación de Bacteriocinas de Lactobacilos como bioconservadores alimentarios.....	22
Tabla 7. Procedencia del material biológico utilizado en la investigación..	31
Tabla 8. Medios de cultivo utilizados para <i>Lactobacillus</i>	33
Tabla 9. Composición de medios de cultivo elegidos para <i>Lactobacillus</i> reportados en la literatura.....	40
Tabla 10. Evaluación de costos de medios de cultivo para <i>Lactobacillus</i> seleccionados en este estudio.....	41
Tabla 11. Costo por litro de cada uno de los componentes del medio MSB.....	41
Tabla 12. Costo por litro de cada uno de los componentes del medio MRS.....	42
Tabla 13. Costo de cada uno de los componentes del medio MRS* por litro.....	42
Tabla 14. Capacidad antimicrobiana de <i>Lactobacillus para paracasei</i> crecido en medio MRS contra <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC) cepa O157:H7 y <i>Salmonella</i>	46
Tabla 15. Halos de inhibición del sobrenadante de cultivos de <i>Lactobacillus</i> sobre <i>Salmonella typhi</i> y EHEC 0157:H7	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Posibles mecanismos de acción de probióticos contra <i>Helicobacter pilory</i>	9
Figura 2. Factores principales que afectan la viabilidad de probióticos desde la producción hasta el tracto gastrointestinal.	10
Figura 3. Características de un probiótico.	11
Figura 4. Administración de probióticos en diferentes formas.	13
Figura 5. Rutas de fermentación de las BAL.	15
Figura 6. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por la formación de poros en la membrana bacteriana.....	20
Figura 7. Recuento celulares de las cepas de <i>Lactobacillus</i> conservados en los dos crioprotectores: G: Glicerol, L: leche en polvo...	37
Figura 8. Recuento del número de microorganismos de <i>Lactobacillus</i> viables, expresado en UFC/ml. UFC/ml de las cepas crecidas en los medios MSB (S), MRS (M) y MRS* (M*).....	43
Figura 9. Biomasa producida por <i>Lactobacillus</i> , expresada en g/L.	44
Figura 10. Actividad antagonista de las cepas de <i>Lactobacillus para paracasei</i> expresada mediante los halos de inhibición de las cepas indicadora O157:H7 y <i>Salmonella typhi</i>	47
Figura 11. Actividad antagonista de los sobrenadantes de <i>Lactobacillus para paracasei</i> A.	48
Figura 12. Adherencia de la cepa 8 y <i>E.coli</i> a células HeLa.	52
Figura 13. Adherencia de la cepa 8 de <i>Lactobacillus para paracasei</i> en los tres medios sobre células HeLa.	53
Figura 14. Adherencia de la cepa 10 de <i>Lactobacillus para paracasei</i> en los tres medios sobre células HeLa.	56
Figura 15. Adherencia de la cepa 17 de <i>Lactobacillus para paracasei</i> en los tres medios sobre células HeLa.	57
Figura 16. Adherencia de la cepa 22 de <i>Lactobacillus para paracasei</i> en los tres medios sobre células HeLa.	58
Figura 17. Adherencia control. A.	59
Figura 18. Cinética de crecimiento de la cepa 22 en medio MSB.....	62

ABREVIATURAS, SIMBOLOS Y UNIDADES

°C	Grados Celsius
m	Micras
µg	Microgramos
µl	Micro litros
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
g	Gramos
GRAS	Reconocido generalmente como seguro (Generally Recognized As Safe) por sus siglas en ingles
h	Horas
L	Litros
ml	Mililitros
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colonias (Colony Forming Units)
BAL	Bacterias Ácido lácticas
MRS	Man Rogosa y Sharper
mm	Milímetros
AU/ml	Unidades de actividad por ml
PBS	Solución salina de fosfatos (Phostate Buffer Saline)
MSB	Caldo de Melaza- soya (Molasse-Soya Broth)
MRS*	Man Rogosa y Sharper modificado
HeLa	Línea celular epitelial de cáncer cervico uterino
EHEC	<i>E.coli</i> enterohemorrágica
ATP	Trifosfato de adenosina
FDA	Administración de drogas y alimentos. (Food and Drug Administration)
FAO	Organización de las naciones unidas para la agricultura y administración
WHO	Organización Mundial de la Salud
FNB	Comité de Alimentos y nutrición
µ _{máx}	Velocidad máxima de crecimiento
µ	Velocidad específica de crecimiento

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Aguamiel: Savia del corazón del Agave pulquero. (*Agave atrovirens*).

Alimentos Funcionales: Alimentos que contienen un componente, nutriente o no nutriente, con actividad selectiva relacionada con una o varias funciones del organismo, con un efecto fisiológico añadido por encima de su valor nutricional.

Bacterias Ácido Lácticas: (BAL), bacterias Gram-positivas, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas (algunas cepas presentan una pseudo-catalasa), con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo, que fermentan carbohidratos para formar principalmente ácido láctico.

Bacteriocinas: Péptidos o proteínas que presentan una gran variedad de características físico-químicas y espectros de acción antimicrobiana reducidos o amplios frente a bacterias Gram-positivas y Gram negativas.

Colon: Segunda porción del intestino grueso, comprendida entre el ciego y el recto. En él se siguen absorbiendo nutrientes y agua de los alimentos que han sido ingeridos, además de que sirve de contenedor para el material de desecho.

Colonia: Grupo de organismos unicelulares que viven en asociación, a menudo derivado de una sola célula.

Cultivo: Crecimiento de microorganismos en un medio de cultivo (solución nutriente). Este crecimiento es llevado en el laboratorio bajo condiciones controladas.

Cultivo axénico ó puro: Cultivo que contiene una única clase de microorganismo.

Electroforesis: Técnica de separación y purificación, utilizada para grupos de moléculas, basadas en la distancia relativa de migración en un campo eléctrico, de acuerdo a las variaciones en el número y clases de grupos cargados que tienen las muestras.

Fase exponencial: Ó logarítmica. Fase de la curva de crecimiento, durante la cual la población microbiana crece de manera constante, con división y duplicación máxima a intervalos regulares.

Fase lag: Fase inicial en la curva de crecimiento de los microorganismos, llamada también fase de latencia o adaptación, en la que no hay reproducción celular, pero sí aumento de la masa individual.

Fermentación Homoláctica: Fermentación que se lleva a cabo por la ruta (vía glicolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas, en la cual da como resultado casi exclusivamente ácido láctico como el producto final, Producción de dos moléculas de ATP a partir de glucosa.

Fermentación Heteroláctica: Esta fermentación es por medio de la enzima 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa dando como resultado cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO₂ además del ácido láctico. (Vía de las pentosas fosfato): Producción de una molécula de ATP a partir de glucosa.

Gram-negativa: Microorganismo que tienen la pared celular más delgada debido a que presentan poco peptidoglicano y presenta una membrana externa con moléculas de lipopolisacáridos, Se tiñen de rojo con el colorante safranina. Ejemplos: *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*.

Gram-positiva: Microorganismo cuya pared consta principalmente de varias capas de peptidoglicano que retienen el cristal violeta utilizado en la tinción de Gram, y está ligado de manera covalente a redes de ácidos teicóicos (polímeros de glicerol solubles en agua). Se tiñe de color morado debido a la presencia del complejo cristal violeta-lugol. Ejemplos: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Lactobacillus*.

Hospedero: Organismo que provee de nutrientes y/o albergue a otro organismo en diversas asociaciones biológicas.

Infeción: Colonización y desarrollo de microorganismos en el huésped. Puede o no dar lugar a una enfermedad manifiesta.

Intolerancia a la lactosa: Inhabilidad para digerir lactosa, un componente de la leche.

***Lactobacillus*:** Bacilos microaerófilos, Gram-positivos y catalasa negativos, estos organismos forman ácido láctico como producto principal de la fermentación de los azúcares, los miembros del género *Lactobacillus* son ubicuos anaeróbicos, y no formadores de esporas incluye mas de 25 especies.

Lactosa: El azúcar encontrado en la leche. El cuerpo usa la enzima lactasa para desdoblar la lactosa en galactosa y glucosa.

Medio diferencial: medio que permite revelar características fisiológicas de los microorganismos. Estos medios son diseñados para grupos microbianos especiales y ellos pueden tener aplicaciones extensas en el aislamiento y la identificación. Ellos pueden permitir en un simple paso, la identificación preliminar de un género y aún de una especie.

Medio selectivo: Medios de cultivo que contienen sustancias inhibitorias o factores únicos de crecimiento para un organismo o un grupo de ellos. Permiten seleccionar a los organismos.

Medio enriquecido o medio complejo (indefinido): medios que contienen nutrientes de composición química no establecida. Son mezclas complejas y poco definidas de nutrientes. Contienen extractos animales, vegetales e hidrolizados de proteínas. Contienen materiales complejos de origen biológico tales como la sangre, la leche, el extracto de levadura o el extracto de carne, Se utilizan cuando se necesita obtener una amplia gama de microorganismos.

Microbiota: Mezcla compleja de bacterias que colonizan un área determinada en el huésped como el tracto gastrointestinal, y genito-urinario, que no ha sido afectado por intervenciones médicas, experimentales o por enfermedades.

Patógeno: Cualquier microorganismo capaz de producir una enfermedad infecciosa. Incluye a los virus, bacterias, hongos y protozoarios. La capacidad de un patógeno para producir una enfermedad se conoce como patogenicidad.

Patógeno oportunista: Microorganismo que, en circunstancias habituales, no causa daño, pero que en ciertas condiciones produce enfermedad (ejemplo: en condiciones que producen inmunodepresión).

Potencial redox: Capacidad de las moléculas para aceptar o donar electrones, es decir, sus características oxidantes o reductoras. Uno de los factores que intervienen en el potencial redox, aunque no el único, es la concentración de oxígeno molecular.

Prebiótico: Ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiosamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un limitado grupo de bacterias en el colon.

Probiótico: Microorganismos viables en suficiente número, los cuales restablecen la microbiota (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped provocando efectos beneficiosos sobre la salud del mismo.

Simbiótico: El término simbiótico es usado en el área de alimentos para referirse aquellos productos que contienen elementos probióticos y prebióticos. La palabra alude al sinergismo, este término debería reservarse para productos en los cuales los componentes prebióticos selectivamente favorecen a los componentes probióticos.

Tinción de Gram: Técnica de tinción diferencial que divide a grandes grupos bacterianos en Gram positivos o Gram negativos de acuerdo a su habilidad para retener el cristal violeta cuando son decolorados con un solvente orgánico, como el etanol.

Unidades de actividad de bacteriocina (UA): Recíproco de la dilución que muestra la inhibición más alta de la cepa indicadora que es expresada en unidades de actividad por ml (AU ml⁻¹).

Unidad formadora de colonia (UFC): Célula bacteriana viva y aislada que en las condiciones adecuadas da lugar a la producción de una colonia de bacterias.

RESUMEN

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances que se han reflejado en muchas de sus aplicaciones industriales, sobre todo en la industria alimentaria. Es en este campo, donde la producción de alimentos funcionales y los probióticos ha tenido un gran auge, debido a su contribución al bienestar en el consumidor. El género microbiano más estudiado por su potencial probiótico es *Lactobacillus*, el cual ha sido aislado de diversos hábitats. El objetivo del presente trabajo, fue evaluar el potencial probiótico de un cultivo con potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus para paracasei* (8, 10, 17, 22) aisladas de aguamiel con tres medios de cultivo formulados según los requerimientos nutricionales para Lactobacilos: 1) medio MRS convencional (Oxoid), 2) medio MRS* modificado (MRS *) (suplementado con cobalamina), y 3) medio MSB (Medio suplementado con soya y melaza). Se determinaron los parámetros: viabilidad, biomasa, antagonismo tanto del paquete celular como del sobrenadante, adherencia a células HeLa. Finalmente se realizó una cinética de crecimiento en el cultivo seleccionado, que presento mejores propiedades, y se confirmaron las características probióticas y producción de ácido láctico. El medio MSB favoreció el recuento celular y biomasa de las cepas, en especial el de la cepa 22. El sobrenadante y el cultivo de la cepa 22, crecida en medio MSB presentaron evidencia de actividad antimicrobiana expresada por halos de inhibición (> 5 mm) del crecimiento de los patógenos EHEC (O157:H7) y *Salmonella serotipo Typhi*, en contraste con el sobrenadante obtenido del medio MRS*, que solo presento actividad contra *Salmonella*. Las cepas crecidas en medio MSB presentaron un patrón de adherencia agregativa más definida sobre células HeLa. La cinética de crecimiento con la cepa 22 en el medio MSB, mostró un recuento máximo de 4.95×10^9 UFC/ml y una biomasa de 8.7 g/L a las 24 h, La $\mu_{\text{máx.}}$ de la cepa fue de 0.30 h^{-1} en ambas condiciones de aireación, alcanzándose a las 8 h de incubación. Los valores máximos de ácido láctico que fueron alcanzados a las 68 h de incubación corresponden a 7.47 g/L, en condiciones de agitación y 7.02 g/L en estático. El costo del medio de cultivo MSB es 53,5% menor al del medio MRS convencional (Oxoid), resultando económicamente más rentable la utilización del medio MSB para la producción de cultivos probióticos con aplicación en la industria de los alimentos.

ABSTRACT

In the last years, the biotechnology has experienced great advances that have been reflected in many of their industrial applications, especially in the food industry. It is in this field, where the production of functional food and the probiotics has had a great summit, due to their contribution to the well-being in the consumer. The microbial genus most studied due the probiotic potential is *Lactobacillus*, which has been isolated of diverse habitats. The aim of this study was to evaluate the potential probiotic from strains of *Lactobacillus para paracasei* (8, 10, 17, 22) isolated of aguamiel. Three media were evaluated formulated according to the nutritional requirements of the Lactobacilos: 1) conventional MRS (Oxoid), 2) modified MRS* (MRS*), (suplemented with cobalamin), and 3) MSB (suplemented with soy bean and molasses). The parameters determined were: viability, biomass, antagonism of the cellular package and of supernatant, adherence to HeLa cells. Finally growth kinetic was realized selected culture, probiotic characteristics and production of lactic acid were confirmed. The MSB media, promoted cell growth and biomass of the strains, especially of the strain 22. The supernatant and bacterial cells of strain 22, grown in MSB medium presented evidence of antimicrobial activity expressed by inhibition halos (> 5 mm) the pathogenic EHEC (O157:H7) and *Salmonella* serotipo *Typhi* growth, in contrast with supernatant obtained of MRS* medium, that only presented activity against *Salmonella*. The strains grown well defined MSB showed an aggregative adherence phenotype to HeLa cells. The growth kinetic carried out with the strain 22 in the media MSB, the strain showed at 12h of growth a maxima cellular viability of 4.95×10^9 UFC/ml and a biomass of 8.7 g/L. The $\mu_{\text{máx.}}$ of the strain was of 0.30 h^{-1} under both aeration conditions, being reached at 8h. of incubation. The maximum values of lactic acid were reached at 68 h of incubation correspond to 7.47 g/L, in conditions of agitation and 7.02 g/L in statically. The cost of the medium of culture MSB is 53,5% minor to that of the conventional MRS (Oxoid), Therefore it demonstrated to be economically more profitable the utilization of this medium for the production of cultures probiótics with application in the industry of the food.

1. INTRODUCCIÓN

Los alimentos funcionales, definidos como aquellos que, además de satisfacer las necesidades nutricionales básicas, proporcionan beneficios para la salud, están irrumpiendo con fuerza en los mercados internacionales, dado el interés creciente de los consumidores hacia la promoción de la salud.

Generalmente, los alimentos funcionales son considerados como aquellos alimentos provistos de componentes biológicamente activos y que pueden ser incluidos como parte de una dieta normal. Dentro de la gran gama de componentes bioactivos encontramos a los probióticos, los cuales son definidos según la Organización para la Agricultura y Nutrición y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO 2001) como: "Microorganismos vivos, los cuales al ser administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud en el huésped" (Anal y Singh, 2007).

Los microorganismos probióticos en humanos incluyen levaduras, y bacterias ácido lácticas (BAL) principalmente de los géneros como: *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus Lactococcus*, *Saccharomyces boulardii*, y ***Lactobacillus*** (Isolauri y cols., 2002; Axelsson, 2004; López-Brea y Domingo, 2007).

El género ***Lactobacillus*** ha sido utilizado para el tratamiento y prevención de desordenes intestinales tanto en animales como en humanos desde hace cientos de años (Salminen y cols., 2004), los Lactobacilos, pueden ser aislados de diversos alimentos y bebidas fermentadas, tanto el aguamiel como el pulque han sido reconocidos como bebidas saludables por siglos. Sin embargo no existe un producto que en la actualidad utilice, con tecnología microbiana, cultivos derivados del aguamiel o del pulque con fines comerciales.

Por otro lado se conoce que los Lactobacilos, tienen requerimientos nutricionales que impactan fuertemente en el costo del medio de cultivo, estos requerimientos pueden ser proporcionados por medios comerciales como el MRS (Man Rogosa Sharpe), sin embargo estos medios resultan costosos debido a que, sus componentes como la glucosa, peptonas, y fosfatos, que aumentan considerablemente el costo. Como alternativa diversos autores

reportan el uso de subproductos industriales como componentes para la formulación de medios de cultivo para *Lactobacillus*, entre los que encontramos, el suero de queso, jarabe de maíz, melaza, soya hidrolizada, etc, que pueden ser fuentes de carbono y nitrógeno económicas para el crecimiento de diversos microorganismos, incluyendo cepas probióticas (Además de que favorecen la producción de sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas) (Leroy y Vuyst, 2001; Guerra y cols., 2001; Hofvendahl y Hahn-Hagerdal., 2000; Oh y cols., 2005; Wee y cols., 2004; Hassan y cols., 2006; Castro y cols., 2008; Fiorentini y cols., 2001). Este hecho, resulta de gran interés para considerar a estos subproductos industriales como componentes en el medio para la producción de cultivos probióticos.

Se han realizado varios estudios sobre el efecto de los componentes de los medios de cultivo sobre la capacidad antagónica de cepas de *Lactobacillus* contra patógenos como *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, y *E.coli*, así también se han estudiado los mecanismos de acción por los cuales los *Lactobacillus* ejercen sus beneficios: la producción de la enzima lactasa, resistencia a pH bajos y sales biliares, la producción de sustancias antimicrobianas (bacteriocinas), la capacidad de adherencia, la estimulación del sistema inmune, (Schrezenmeir y Vrese, 2001; Nowroozi y cols., 2004; Vicente y cols., 2007).

El principal objetivo de este estudio fue evaluar la capacidad probiótica de cepas autóctonas de *Lactobacillus* aisladas de aguamiel en medios con componentes de bajo costo, para la posible aplicación en la alimentación humana y animal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Alimentos Funcionales

El término “Alimento Funcional”, se acuñó inicialmente en Japón en la década de los 80's, donde se desarrolló el concepto de FOSHU, para referirse aquellos alimentos que tienen efectos benéficos a la salud (Stanton y cols., 2001). El término “Alimento Funcional”, según el Comité de Alimentos y Nutrición (FNB) de la Academia Nacional de Ciencias, es definido como aquel alimento, que abarca a productos saludables, incluyendo a cualquier alimento modificado o ingrediente de un alimento que provee un beneficio a la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene (Milner, 2000).

Dentro de la concepción europea, un alimento funcional debe ser, en todo momento un alimento; es decir, es necesario que ejerza su efecto benéfico consumido como alimento, dentro de una dieta convencional y en la cantidad en que habitualmente es ingerido. Esta perspectiva no incluye por tanto, a los denominados nutraceuticos (Silveira y cols., 2003). Los Alimentos Funcionales comprenden:

- Alimentos convencionales que naturalmente cuentan con sustancias bioactivas. Siendo la fibra dietética la más común.
- Alimentos enriquecidos con sustancias bioactivas: Antioxidantes, **probióticos**, prebióticos, fibra soluble, omega 3, grasas poli-insaturadas, ácido linoleico, vitaminas, minerales, algunas proteínas, péptidos, aminoácidos, fosfolípidos, entre otros (Grajek y cols., 2005).

Estudios clínicos realizados en diferentes ciudades han demostrado un gran número de efectos positivos a la salud relacionadas con el consumo de alimentos funcionales, tales como: reducción de cáncer, estimulación del sistema inmune, disminución de síntomas menopáusicos, mantenimiento de la salud del tracto gastrointestinal y urinario, efectos anti-inflamatorios, reducción de la presión arterial, reducción de osteoporosis y efectos antiobesidad (Grajek y cols., 2005; Pereira y cols., 2002; Oxman y cols., 2001; De Roos y Katan, 2000; Pereira y cols., 2003). En la Tabla 1 se presenta un resumen de los objetivos que se persiguen al consumir alimentos funcionales.

Tabla 1. Efectos y beneficios esperados de los Alimentos Funcionales

<p>Desarrollo fetal y en los primeros años de vida</p> <ul style="list-style-type: none">• Crecimiento• Desarrollo (Sistema Nervioso Central; otros sistemas y órganos)• Diferenciación <p>Aparato Digestivo</p> <ul style="list-style-type: none">• Modificación y equilibrio de la microbiota colónica.• Inmunidad• Incremento de la biodisponibilidad de nutrientes• Mejora del tránsito/motilidad• Proliferación celular• Fermentación de sustratos <p>Aparato Cardiovascular</p> <ul style="list-style-type: none">• Homeostasis de lipoproteína• Integridad endotelial• Antitrombogénesis <p>Metabolismo de macronutrientes</p> <ul style="list-style-type: none">• Mejora de la resistencia a la insulina• Rendimiento óptimo de actividad física• Mantenimiento de peso• Composición corporal (grasa) <p>Metabolismo xenobiótico</p> <p>Esfera psíquica</p> <ul style="list-style-type: none">• Cognición• Estado de ánimo• Nivel de estrés emocional
--

Tomado: Silveira y cols., 2003.

Estos efectos benéficos de ser confirmados, deberán mencionarse en la etiqueta de los productos alimenticios, para su promoción en el mercado. En la actualidad, la biotecnología juega un papel clave en la industria de los alimentos funcionales, hasta ahora, se ha dado una alta prioridad a la producción de los probióticos, prebióticos, antioxidantes, vitaminas y calcio. Los productos que contienen microorganismos probióticos son los que mejor representan este grupo de alimentos. Se han realizado intensas investigaciones y esfuerzos en la manera de desarrollar productos, principalmente lácteos, que contengan microorganismos probióticos (Toma y Pokrotnieks, 2006; Roberfroid, 2000).

2.2 Probióticos

El término probiótico deriva del lenguaje griego que significa “para la vida”, fue usado por primera vez en el año 1965 por Lilly y Stillwell, para describir a aquellas sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otras, en contraposición al término antibiótico (Schrezenmeir y Vrese, 2001). La definición hecha por Havenaar y Huis In't Veld se considera la más acertada para el término **probiótico**: “preparación o producto que contiene microorganismos viables en suficiente número, los cuales restablecen la microbiota (por implantación o colonización) en un compartimiento del huésped provocando efectos benéficos sobre la salud del mismo” (Schrezenmeir y Vrese, 2001). Esta definición, hace hincapié en la presencia de microorganismos viables (ya sea como células liofilizadas o en productos frescos o fermentados), en número suficiente para provocar los efectos benéficos sobre la salud, a través de una restablecimiento de la microbiota endógena por colonización del intestino (Schrezenmeir y Vrese, 2001; Scott, 2001; Oyetayo, 2005).

Los probióticos se instalan en la mucosa intestinal y ahí producen las sustancias inhibitorias que combaten la acción de bacterias toxigénicas, por lo tanto ésta población microbiana, representa un potencial metabólico importante que no solo mantiene los procesos de digestión sino que también actúa sobre los procesos de detoxificación, llevados a cabo en el intestino, además de la estimulación del sistema inmunológico (Holzapfel, 2006; Mountzouris y cols., 2007; Hosada y cols., 1996; Gratz y cols., 2007; El-Nezami y cols., 2000; Oatley y cols., 2000). Las actividades metabólicas benéficas de las bacterias intestinales incluyen también la síntesis de vitaminas B y K, la producción de ácidos grasos de cadena corta, los cuales sirven como fuentes de energía para los tejidos del huésped, así como, la conversión de carcinógenos presentes en la dieta a compuestos inactivos (Schmid y cols., 2006).

2.2.1 Propiedades de los Probióticos

Para alcanzar el estatus de probiótico, el microorganismo debe cumplir un número de criterios relacionados a la seguridad, efectos funcionales, y propiedades tecnológicas (Oyetayo, 2005).

2.2.2 Bioseguridad:

Los cultivos probióticos disponibles en el mercado deben contar con estudios clínicos donde han sido cuidadosamente evaluados respecto a su inocuidad, los probióticos no deben producir sustancias tóxicas, ni metabolitos que puedan dañar al organismo huésped, es decir deberían ser reconocidos generalmente como seguros (microorganismos GRAS por sus siglas en inglés) (Kosin y Rakshit, 2006; Oyetayo, 2005). En la Tabla 2 se presentan los principales microorganismos **probióticos** y su estatus de seguridad potencial.

Tabla 2. Microorganismos probióticos y su estatus de seguridad.

Organismo	Infección potencial
<i>Lactobacillus</i>	No patógenos
<i>Lactococcus</i>	No patógenos
<i>Streptococcus</i>	Oportunistas, solo <i>S. thermophilus</i> es usado en productos lácteos
<i>Enterococcus</i>	Oportunistas, solo algunas cepas tienen resistencia a antibióticos.
<i>Bacillus</i>	Solo <i>B. subtilis</i> , es reportado en uso probiótico.
<i>Bifidobacterium</i>	Principalmente no patógenos, algunas cepas son aisladas a partir de infección humana.
<i>Propionibacterium</i>	Candidato potencial para probióticos.
<i>Saccharomyces</i>	No patógeno, algunas cepas son aisladas de infecciones humanas.

Tomado: Chukeatirote, 2003.

2.2.3 Resistencia a los ácidos y sales biliares.

Cuando se evalúa el potencial de los probióticos, es necesario considerar su habilidad para resistir los efectos de los ácidos y sales biliares. El microorganismo probiótico debe sobrevivir al tránsito a través del estómago para poder colonizar el intestino y llevar a cabo su función probiótica. Se han realizado experimentos preliminares para determinar el grado de resistencia a los ácidos y sales biliares mostradas por varias cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aisladas a partir de ileum humano. La sobrevivencia de las cepas bacterianas a los ácidos y sales biliares es inicialmente evaluada por la adición de 1×10^9 UFC/ml de Lactobacilos en medio MRS seguido de la adición de cloruro de hidrógeno con valores de pH entre 2.0 y 3.4., además de la adición de bilis humana, bobina o porcina a concentraciones entre el 0.3% y 7,5% bajo condiciones anaeróbicas observándose el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* después de 24-48 horas (Dunne y cols., 2001; Cotter y Hill, 2003; Chang y cols., 2001; White y cols., 2006).

2.2.4 Capacidad antimicrobiana de cepas probióticas

En los últimos años en diversas investigaciones se ha demostrado el efecto antagónico que poseen varias especies probióticas sobre microorganismos deterioradores de alimentos, así como, de patógenos intestinales (Calderón y cols., 2007; Kabir y cols., 1997; Aiba y cols., 1998; Coconnier y cols., 1998). La producción de compuestos antimicrobianos es una característica de la mayoría de las bacterias. Una gran variedad de sistemas de defensas microbiana son producidas, incluyendo antibióticos clásicos de amplio espectro, subproductos metabólicos tales como, ácidos orgánicos, agentes líticos tales como, la lisozima y varios tipos de exotoxinas (Motta y cols., 2004).

En varios estudios, se ha reportado que los probióticos incluyendo los géneros de *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, y *Enterococcus* entre otros, y pueden inhibir el crecimiento de un amplio número de bacterias patógenas causantes de Enfermedades Transmitidas por Alimentos (ETAs), como *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, y *Listeria monocytogenes* (por diferentes mecanismos como la producción de sustancias inhibitorias como el peróxido de hidrógeno, ácido láctico y bacteriocinas (Onda y cols., 2002; Maldonado y cols., 2005; Rojo y cols., 2007; Powell y cols., 2007; Oyetayo, 2005; Ogawa y cols., 2005; Chang y cols., 2001; Piyawan y cols., 2006; Meng-Tsung y cols., 2006).

2.2.5 Actividad β -Galactosidasa

Los probióticos son excelentes asimiladores de lactosa debido a producción de de enzimas como la de β -Galactosidasa o fosfo- β -Galactosidasa. El hecho resulta significativo en los sujetos que presentan intolerancia hacia la lactosa, porque la, Beta-galactosidasa producida por los probióticos parece estimular la producción de la lactasa; en consecuencia, se obtiene una mayor tolerancia a la lactosa ya que la enzima determina la hidrólisis de glucosa y de galactosa (Ibrahim y O' Sullivan, 2000).

2.2.6 Adherencia a las células intestinales y colonización del intestino

Los cultivos de tejidos celulares se han desarrollado desde los últimos años del siglo XX, con el objetivo de reproducir las condiciones *in vivo* que permitan el crecimiento de las células, manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. Los cultivos celulares permiten evaluar

diferentes tópicos o mecanismos, tales como la actividad intracelular, interacciones celulares y la adherencia (Fresney, 1990).

La importancia de la adhesión a células epiteliales del intestino para el establecimiento de microorganismos probióticos en el ecosistema del tracto gastrointestinal, ha sido demostrada en estudios clínicos (Alander y cols., 1997; Ogawa y cols., 2005). La adhesión a la mucosa intestinal es importante para la modulación de la respuesta inmune del huésped y la exclusión de patógenos tales como, *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp*, *Listeria sp*, *E. coli*, y *Clostridium sp*. La adherencia de *Lactobacillus rhamnosus* al tracto gastrointestinal de niños y adultos, ha sido estudiada (Goldin y cols., 1992; Gopal y cols., 2001; Ingrassia y cols., 2005). Además se han realizado estudios *in vitro*, sobre la inhibición de la adherencia de patógenos como *E. coli*, *Salmonella typhimurium* y *Enterococcus faecalis*, por bacterias ácido lácticas. (Todokiri y cols., 2001). Existen diversas líneas celulares con las que se puede trabajar según el tipo de estudio que se quiera realizar, para estudios de adherencia celular de probióticos, las líneas más utilizadas son la Caco-2, HEp-2 y HeLa, aisladas a partir de tumores primarios de colon de humano, laringe humana y cáncer cervico uterino, respectivamente, cultivadas en medio mínimo esencial de Eagle (MEM), éstas líneas expresan características morfológicas y fisiológicas de enterocitos normales humanos. Estas líneas han sido estudiadas para elucidar los mecanismos involucrados en la adhesión y colonización del intestino (Dunne y cols., 2001; Henriksson y cols., 1999; Cotter y Hill., 2003; Oyetayo, 2005; Chang y cols., 2001). Los ensayos de adhesión se llevan a cabo para evaluar la adherencia de microorganismos, mecanismos de colonización y reconocimiento de receptores celulares, lo cuál puede ser evaluado por microscopia utilizando la coloración de Giemsa (Kumura y cols., 2004). De esta manera, se pueden evidenciar diferentes patrones de adherencia: localizada, agregativa o difusa, y para fines de este estudio resulta útil ya que permite observar la adherencia de los microorganismos probióticos.

Durante la preselección de cepas probióticas se debería evaluar la adhesión al epitelio intestinal y la habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal. La importancia de estas pruebas es debido al hecho de que muchos probióticos no colonizan al huésped, por lo tanto, la adherencia es un factor clave que se refiere a la colonización de algunos sitios específicos y la sobrevivencia de

microorganismos en diferentes hábitats que depende de su habilidad para adherirse a varias superficies o capas.

En la figura 1, se observan los posibles mecanismos de acción de los probióticos en la inactivación del patógeno *H. pylori*, existen un número de posibles hipótesis de estudios *in vitro* de respuestas en células epiteliales o respuesta inmune a los probióticos, Los probióticos interfieren potencialmente con *H. pylori* para la producción de sustancias antimicrobianas (1), induciendo agregación (2) y compitiendo con los sitios del huésped-adherencia- célula (3). Se modulan respuestas inflamatorias (4) y se consolida la barrera de la mucosa (5). Modulación diferencial de la producción de sustancias antimicrobianas. (6). Producción de la inmunoglobulina A (García y cols., 2007; Sgouras y cols., 2004).

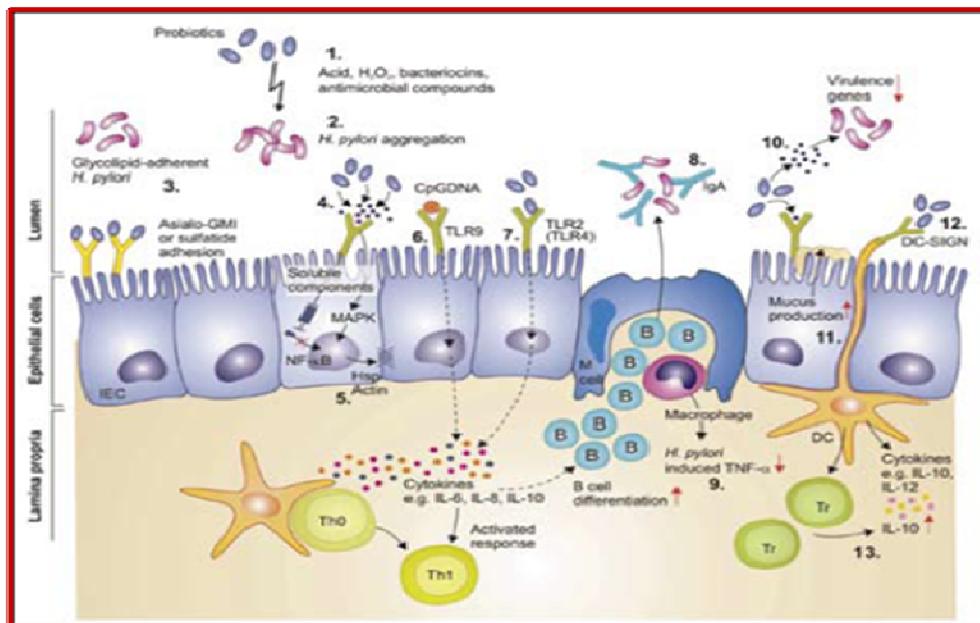


Figura 1. Posibles mecanismos de acción de probióticos contra *Helicobacter pylori*
Tomado: García y cols., 2007.

2.2.7 Estimulación del sistema inmune

Se han realizado muchos estudios en humanos para investigar los efectos de cultivos probióticos sobre el sistema inmune. Estos estudios revelan que las bacterias probióticas son capaces de aumentar tanto la inmunidad innata como la adquirida, por el aumento de la actividad de células y fagocitosis, cambiando perfiles de citocinas, e incrementando los niveles de inmunoglobulinas (Wold, 2001). Se han desarrollado dos cepas probióticas con un enfoque particular sobre su efecto sobre la respuesta inmune: HOWARU™ Bifido (*Bifidobacterium lactis* HN019) y HOWARU™ Rhamnosus (*Lactobacillus rhamnosus* HN001), ambas cepas han demostrado en varios estudios el incremento natural de la

función inmune en personas saludables (Arunachalam, 2000; Oyetayo, 2005; Brink y cols., 2003; Reid, 1999).

2.2.8 Viabilidad de organismos probióticos.

La viabilidad y estabilidad, son características que se desean mantener en los probióticos durante los procesos de manufactura y vida de anaquel de los alimentos, para asegurar que se encuentren en dosis suficientes y de esta manera asegurar que al ser consumidos, se mantengan vivos a través del tracto gastrointestinal y puedan colonizar el intestino delgado y por consecuencia puedan mantener su función biológica sobre el huésped (Riordan y cols., 2001; Sandholm y cols., 2002; Gouesbet y cols., 2002; Galdeano y Perdigon, 2004; Zarate y Macías, 2006). La federación internacional de lácteos ha recomendado que las bacterias deben ser activas, y estar presentes en el producto alimenticio en un número de al menos 10^7 UFC/g hasta la expiración del producto (Kim y cols., 2008). Las tecnologías que pueden proteger la viabilidad de probióticos durante la manufactura, almacenamiento y tránsito gastrointestinal son altamente deseadas, (Figura 2), numerosas estrategias de microencapsulación han sido estudiadas para proteger a las bacterias probióticas del estrés ambiental, debido a la presencia de oxígeno, calor y otros factores ambientales durante la formulación y almacenamiento, además de la protección contra pH bajo, y proteasas durante el tránsito gastrointestinal (Crittenden y cols., 2006).



Figura 2. Factores principales que afectan la viabilidad de probióticos desde la producción hasta el tracto gastrointestinal. Tomado: Lacroix y Yildirim, 2007.

Como se menciona en el apartado anterior hay numerosos estudios que intentan definir los parámetros necesarios para caracterizar un candidato como potencial probiótico, sin embargo en la figura 3 se muestra un consenso general de las propiedades deseables de los probióticos (McFarland y Elmer 2006).

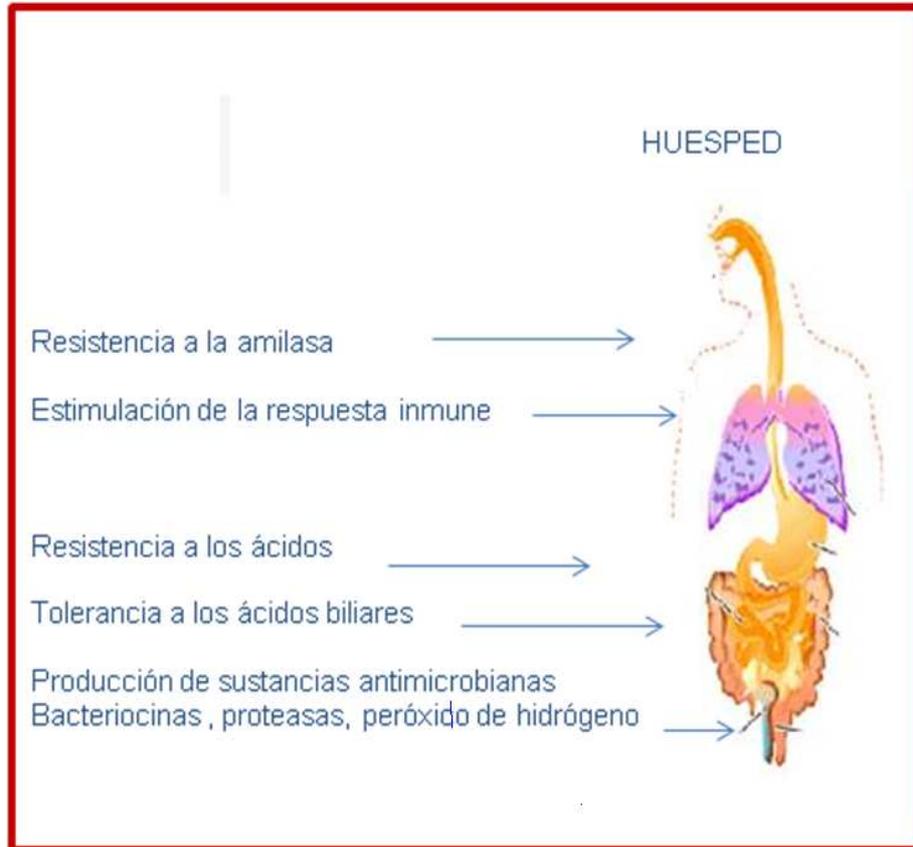


Figura 3. Características de un probiótico.
Tomado: McFarland y Elmer., 2006

2.3 Efectos benéficos de los probióticos

Los probióticos tradicionalmente han sido utilizados en el tratamiento y prevención de varias enfermedades, en particular especies de Lactobacilos y Bifidobacterias se encuentran entre las más utilizados y estudiados. Se han realizado estudios clínicos sobre el efecto de los probióticos sobre la salud del consumidor (Riordan y cols., 2001; Reid, 1999; Saavedra y cols., 1994; Szajewska y cols., 2001; López-Brea y Domingo, 2007; Perdone y cols., 1999; Guandalini y cols., 2000; Braat y cols., 2004; Marteau y cols., 2001; Bezkorovainy, 2001; Oozeer y cols., 2006), a continuación se describen reportes de estos estudios condensados en la tabla 3:

Tabla 3. Efectos y beneficios reportados de los probióticos.

Desorden	Sujeto	Probióticos	Efecto	Referencias
Diarrea infantil	Humano	<i>Lactobacillus GG</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> . <i>Lactobacillus johnsonii</i>	Reduce la duración de la diarrea Interfiere con el ciclo celular de <i>Giardia intestinalis</i>	Guandalini y cols., 2000; Braat y cols., 2004; Humen y cols., 2005
Diarrea asociada a antibióticos	Humano	<i>Lactobacillus GG</i> <i>B.breve</i> <i>B. longum</i>	prevención de diarrea por rotavirus Reduce la incidencia a la diarrea	López –Brea y Domingo, 2007; Coconnier y cols., 1997;
Colitis por <i>Clostridium difficile</i> .	Humano	<i>Lactobacillus GG</i> <i>Lactobacillus GG</i>	Reduce incidencia a la diarrea.	Hilton y cols., 1997; Huebner y Surawics, 2006; Marteau y cols., 2001;Bezkorovainy, 2001
Diarrea del viajero	Humano	<i>L.ácidophilus</i> + <i>B.bifidum</i>	Disminuye la incidencia de la diarrea	Canducci y cols., 2000; Felley y cols., 2001
Exclusión de patógenos originados por alimentos	Ratón Conejo Humano	<i>L. casei Shirota</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Bifidobacterium lactis</i>	Incrementa la resistencia a infecciones letales con <i>Salmonella</i> , <i>E. coli</i> y <i>L. monocitogenes</i> .	Canducci y cols., 2000; Felley y cols., 2001 Ogawa y cols., 2001; Shu y cols., 2000; Marteau y cols., 2001
Alergia a los alimentos	Humanos	<i>Lactobacillus GG</i>	Modula la respuesta inmune hacia antígenos dietética.	Kalliomaki y cols., 2001; Isolauri, 2001. McCracken y Lorenz, 2001
Transtornos del aparato urogenital	Humanos	<i>Lactobacillus ácidophilus</i> <i>Lactobacillus GG</i>	Exclusión competitiva de patógenos. Erradicación de vaginosis bacteriana	López-Brea y Domingo, 2007; Reid y Bruce, 2001. Maldonado y cols., 2005; Reid y cols., 2001b; Reid y cols., 1995; Reid, 1999; Hilton y cols., 1995; Strus y cols., 2005; Kale y cols., 2005
Tratamiento de cáncer	Humano	<i>Lactobacillus GG</i> .	Posible liberación de tolerógenos de alérgenos.	EI-Nezami y cols., 2000.

Modificado de: Fooks y Gibson, 2002.

2.4 Administración y consumo de probióticos

Las cepas vivas especialmente del grupo *Lactobacillus ácidophilus* y *Bifidobacterium bifidum* fueron por primera vez suplementadas a los productos lácteos en Alemania, a finales de los 60, debido a su esperada adaptación al intestino y a los beneficios sensoriales para producir yogurts acidificados. Tales productos primero empezaron a conocerse como yogurts ligeros, mientras que en Estados Unidos, la leche *acidophilus* fue mejor conocida (Holzapfel, 2006).

Los probióticos pueden ser administrados en diferentes formas, incluyendo a los alimentos fermentados, y productos farmacéuticos en forma microencapsulada (figura 4.). Se han realizado intensas investigaciones y esfuerzos en la manera de desarrollar productos alimenticios que contengan microorganismos probióticos, tales como especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, estas aplicaciones se han enfocado principalmente a productos lácteos, siendo el yogurt el principal representante., sin embargo también en los alimentos no lácteos tales como carne, vegetales fermentados y jugos de frutas (Holzapfel, 2006).

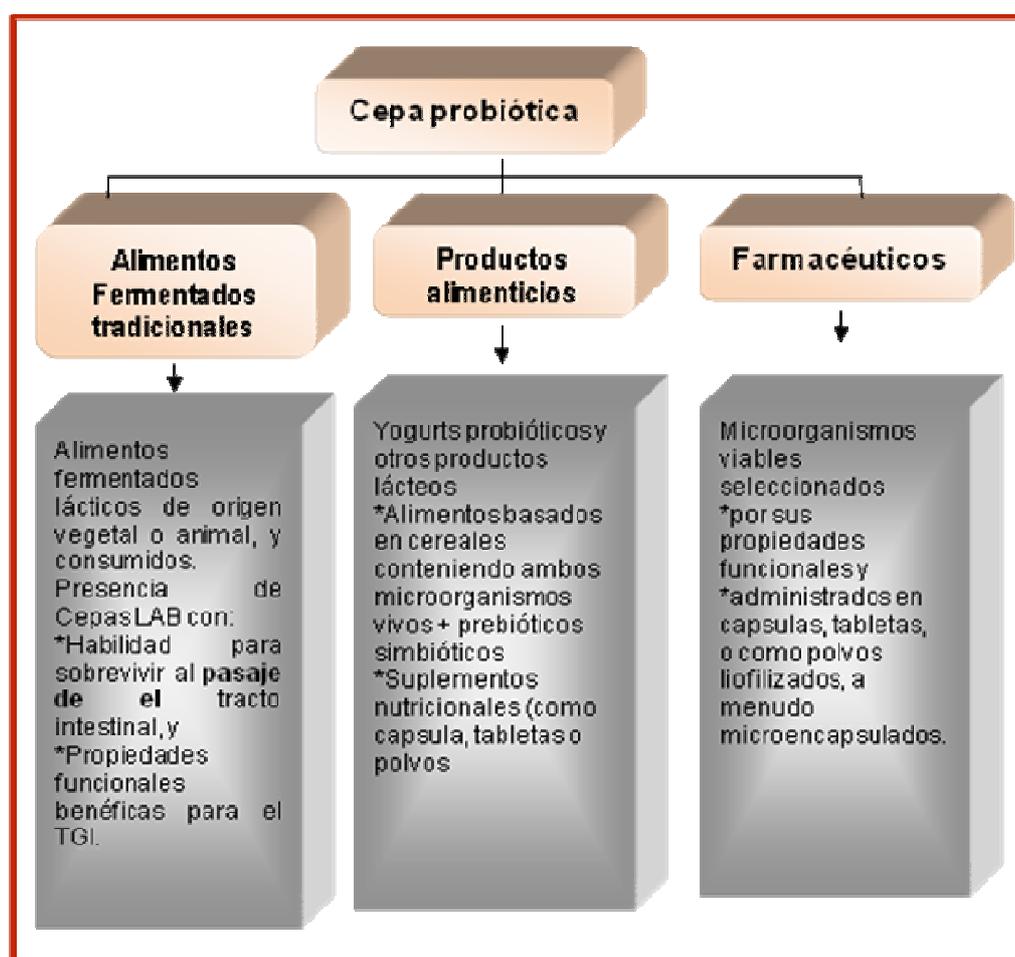


Figura 4. Administración de probióticos en diferentes formas.
Tomado: Holzapfel, 2006.

Los microorganismos empleados actualmente en la elaboración de productos fermentados incluyen diferentes **BAL**, especialmente de los géneros *Lactobacillus* y *Pediococcus*, siendo sus especies bacterianas más representativas: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Pediococcus pentosaceus* y *Pediococcus acidilactici* (Hui, 2006;

Heller, 2006; Kröckel y cols., 2003; Schrezenmeir y Vrese, 2001; Holzapfel, 2006). En la elaboración de productos fermentados los microorganismos desempeñan un papel decisivo, ya que están directamente implicados en la reducción de nitratos a nitritos, el descenso de pH, la formación del aroma, la estabilidad del color y la capacidad de conservación del producto.

3. Bacterias Ácido Lácticas

3.1 Taxonomía

Las bacterias ácido lácticas (BAL) forman un grupo natural de bacterias Gram-positivas, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas, (algunas cepas presentan una pseudo-catalasa), con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo, que fermentan carbohidratos para formar principalmente ácido láctico. Aunque taxonómicamente forman un grupo bastante heterogéneo, los géneros incluidos son *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, y *Tetragenococcus* (Axelsson, 2006).

La clasificación de las BAL, está basado principalmente en la morfología, modo de fermentación de glucosa, clase de carbohidratos que fermenta, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, habilidad para crecer a altas concentraciones de sal, tolerante a condiciones ácidas y alcalinas. Otras características utilizadas en la clasificación de las BAL son las hidrólisis de arginina, formación de acetoína, tolerancia a bilis, tipo de hemólisis, requerimientos de factores de crecimiento, presencia de ciertas enzimas (β -galactosidasa, β -glucoronidasa), características de crecimiento en leche, y tipificación serológica. También se incluyen enfoques quimiotaxonómicos y moleculares, tales como composición de ácidos grasos y constituyentes de la pared celular son también usados en la clasificación, porcentaje de G+C en el DNA y movilidad electroforética de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) (Vandamme y cols, 1996; Axelsson, 2006).

3.2 Metabolismo de BAL

La característica esencial del metabolismo de las BAL es la eficiencia de fermentación de carbohidratos, la generación de Trifosfato de Adenosina (ATP), es subsecuentemente usado para propósitos biosintéticos además la enorme capacidad para degradar diferentes carbohidratos y compuestos relacionados.

Generalmente el producto final predominante es por supuesto el ácido láctico. Sin embargo, las BAL se adaptan de acuerdo a varias condiciones y cambian su metabolismo esto puede llevar a los diferentes productos finales de fermentación. Los niveles y proporciones de los productos finales de la fermentación que se acumulan dependen de las especies de BAL involucradas, la composición química del ambiente de cultivo y las condiciones físicas que hay durante el proceso fermentativo (Vandamme y cols, 1996; Axelsson, 2006).

3.3 Rutas principales de fermentación

Dos rutas de fermentación del azúcar pueden ser distinguidas en las bacterias ácido lácticas (Hui, 2006). En la figura 5 se muestra las dos rutas de fermentación para las BAL.

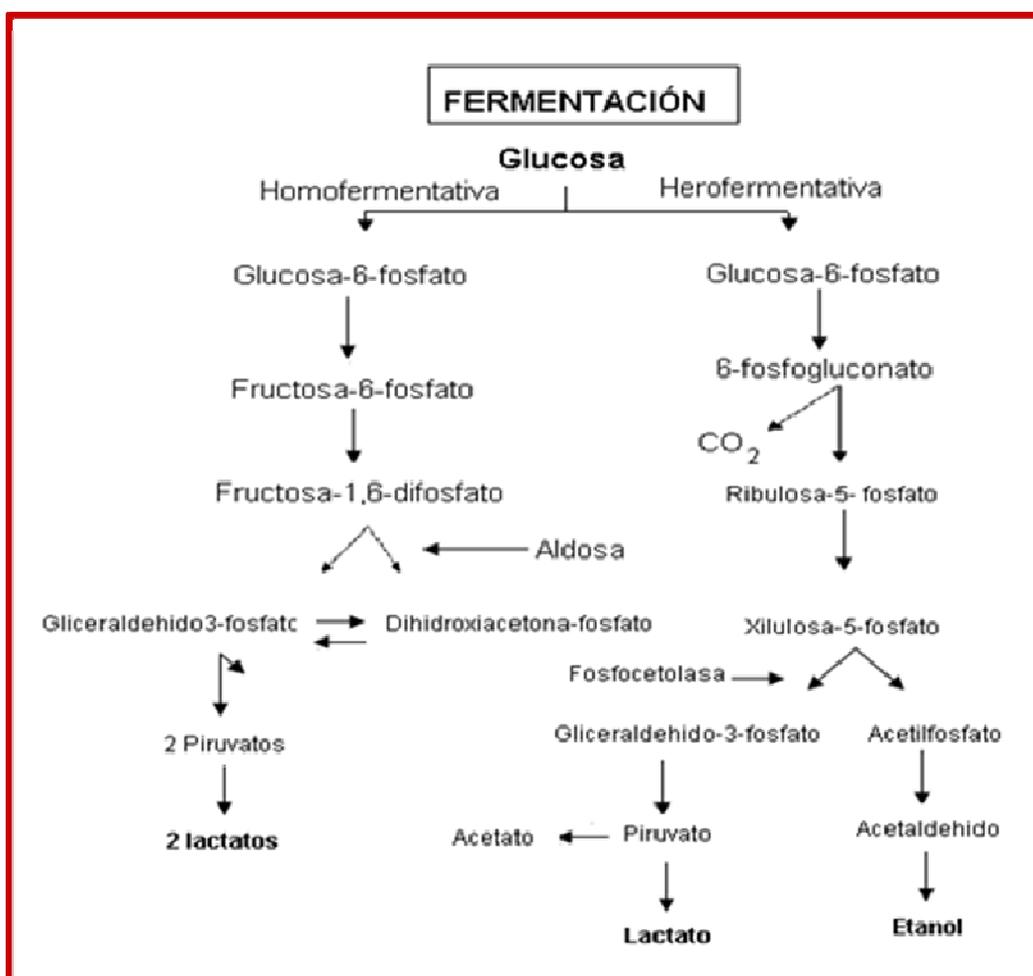


Figura 5. Rutas de fermentación de las BAL.
Tomado: Hui, 2006.

- 1) Fermentación Homoláctica: O también llamada Glucólisis (rutas Embden-Meyerhoft) resultando casi exclusivamente en ácido láctico como el

producto final, (vía glicolítica o de Embden-Meyerhof-Parnas): *Lactococos*, *Pediococos*, *Streptococos*, *Lactobacilos* homofermentadores. Metabolizan las hexosas principalmente a ácido láctico, con un rendimiento neto de dos moles de ATP por mol de hexosa fermentado.

- 2) Fermentación Heteroláctica: Esta fermentación es por medio de la enzima 6-fosfogluconato/fosfoacetolasa dando como resultado cantidades significativas de otros productos finales tales como etanol, acetato y CO₂ además del ácido láctico. *Leuconostocs*, *Lactobacilos* heterofermentadores. En la fermentación de hexosas, el ácido láctico comprende el 70% de los productos catabólicos finales, junto con cantidades equimolares de CO₂ y acetato o etanol. El rendimiento neto es de un mol de ATP por mol de hexosa (Vandamme y cols, 1996).

Los productos finales de la fermentación de las BAL de más interés en la industria alimenticia son ácidos orgánicos, dióxido de carbono, diacetilo, y las bacteriocinas. Además de la producción de metabolitos primarios, se pueden formar otros compuestos antimicrobianos por las diferentes BAL (Ouweland y Vesterlund, 2004; Ogunbanwo y cols., 2003). La habilidad de las BAL para producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada históricamente para la conservación de los alimentos. A continuación se mencionan algunas sustancias antimicrobianas producidas por las BAL, y cómo influyen en muchas de las propiedades benéficas atribuidas a estos microorganismos.

Ácidos orgánicos: Se ha observado que el ácido propiónico y láctico, tiene una fuerte actividad antimicrobiana. Debido a que la reducción del pH causado por éstos ácidos permeabiliza las membranas de las células, por lo tanto incrementa la actividad de otras sustancias antimicrobianas como el peróxido de hidrógeno (Alakomi, 2000).

Peróxido de hidrógeno: El efecto bactericida del peróxido de hidrógeno ha sido atribuido a su fuerte efecto oxidativo sobre las células bacterianas, los grupos sulfidril de proteínas celulares y membranas de lípidos pueden ser

oxidados. El peróxido de hidrógeno produce reacciones que disminuyen el oxígeno, por lo tanto crean un ambiente anaeróbico que es desfavorable para ciertos organismos. La producción de peróxido de hidrógeno es particularmente importante para la colonización del tracto urogenital por *Lactobacillus*. Se ha encontrado que la colonización por *Lactobacillus* disminuye la adquisición de gonorrea, e infecciones del tracto urogenital (Martínez y cols., 2008).

Dióxido de carbono: El dióxido de carbono (CO₂) es formado durante la fermentación del ácido láctico de las hexosas, pero también por muchas otras vías metabólicas generan dióxido de carbono durante la fermentación. El dióxido de carbono tiene un efecto antimicrobiano (Martin y cols., 2006). El mecanismo de esta actividad es desconocido pero se ha sugerido que la descarboxilación enzimática es inhibida y que la acumulación de dióxido de carbono en la bicapa lipídica causa disfunción en la permeabilidad de la membrana, a bajas concentraciones el dióxido de carbono puede estimular el crecimiento de algunos organismos, mientras que a altas concentraciones se puede prevenir su crecimiento. Debido a su actividad antimicrobiana, el CO₂ es ahora comúnmente usado como principal componente de la atmósfera modificada. Las bacterias Gram-negativas han mostrado ser más sensibles al CO₂ que las bacterias Gram-positivas (Devlieghere, 2000).

Diacetilo: El Diacetilo (2-3-butanediona) fue identificado por van Niel y colaboradores como el componente del aroma y sabor en la mantequilla. Este compuesto es producido por especies y cepas del género *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, entre otros organismos. Se encontró que el diacetil es más activo contra bacterias Gram-negativas, levaduras y hongos en comparación a las bacterias Gram-positivas, las BAL, fueron menos sensibles a este compuesto (Lanciotti y cols., 2003).

4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas constituyen un grupo heterogéneo de péptidos o proteínas que presentan una gran variedad de características físico-químicas y espectros de acción antimicrobiana reducidos o amplios frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En los últimos años se le ha dado gran importancia a bacteriocinas-BAL primeramente debido a su aplicación potencial como conservador en alimentos para inhibir el crecimiento de patógenos, especialmente *Listeria monocytogenes*. Como resultado en la pasada década se han identificado y caracterizado un gran número de bacteriocinas (Bruno y Montville, 1993; Ivanova y cols., 2002; Todorov y Dicks, 2007; Savadogo y cols., 2006; Stern, 2006; Savadogo y cols., 2006; Guerra y cols., 2007a; Todorov y Dicks, 2007; Bauer y cols., 2005).

4.1 Clasificación

Como se desprende de su propia definición, las bacteriocinas son compuestos inhibidores de naturaleza peptídica. De hecho, la inactivación por proteasas es uno de los primeros criterios para definir una sustancia antimicrobiana como bacteriocina. Actualmente se conoce la estructura primaria de numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, bien por secuenciación directa de los péptidos purificados o por traducción del correspondiente ADN. Aunque la mayoría de ellas están constituidas por aminoácidos biológicos, es de destacar la presencia de aminoácidos modificados (lantionina y β -metil lantionina y sus precursores dehidroalanina y dehidrobutirina) en la forma activa de aquéllas que reciben el nombre genérico de lantibióticos. Incluso se ha identificado la presencia de D-alanina en la lactocina S, lantibiótico producido por *Lactobacillus sake*. No obstante, independientemente de su composición, las bacteriocinas son péptidos catiónicos, con un punto isoeléctrico alto, que comparten un marcado carácter hidrofóbico (Oscáriz y Pisabarro, 2001).

Teniendo en consideración sus propiedades físico-químicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se han clasificado en 4 grandes clases (tabla 4) (Kwaadsteniet, 2006; Oscáriz y Pisabarro, 2001; Ogunbanwo y cols., 2003).

Tabla 4. Clases de Bacteriocinas producidas por LAB

Clase	Descripción
Clase I (lantibióticos)	Llamados lantibióticos son pequeños péptidos (< 5 kDa) los lantibióticos cuentan con un aminoácido inusual que no se encuentra normalmente en la naturaleza (ejemplo lantionina y β -lantionina), estos aminoácidos inusuales, son sintetizados por modificaciones postransduccionales.
Clase II	Son péptidos estables al calor, pequeño tamaño molecular (<10 kDa), termoestables y no modificados, no contienen lantionina, típicamente para esta clase su espectro de inhibición es más estrecho.
Clase III	Proteínas de alto peso molecular, lábiles al calor, esta clase por lo tanto puede incluir a las enzimas extracelulares bacteriolíticas no lantibióticos de elevado tamaño molecular (>30 kDa) y termolábiles, se ha sugerido una cuarta clase de bacteriocinas con estructura compleja pero aun no se ha generalizado
Clase IV	Bacteriocinas complejas: proteínas con lípidos o carbohidratos.

Modificado: Ouwehand y Vesterlund 2004.

4.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Las bacteriocinas pueden poseer un modo de acción bactericida o bacteriostático sobre las células sensibles, esto es influenciado por varios factores tales como la dosis de las bacteriocinas y el grado de purificación, condiciones experimentales por ejemplo (temperatura, pH, presencia de agentes que rompen la integridad de la pared celular y otros compuestos antimicrobianos) (Oppegard y cols., 2007; Diep y cols., 2007).

La mayoría de las bacteriocinas ejercen un modo de acción bactericida contra los microorganismos sensibles, aunque algunas como la Lactocina 27, Leucocina A-UAL 187 y la Leucocina S han mostrado actuar de modo bacteriostático (Bruno y Montville, 1993). La actividad bactericida de las bacteriocinas puede ser acompañada por lisis de las células sensibles (bacteriocinas bacteriolíticas) esto es el caso de la Nisina. La mayoría de las bacteriocinas de las bacterias lácticas ejercen su acción antimicrobiana desestabilizando y permeabilizando la membrana citoplasmática de las células

sensibles (Gravesen y cols., 2004; Bruno y Montville, 1993; Rojas y Vargas, 2008; Barefoot y Nettles, 1993).

El blanco primario de acción de las bacteriocinas parece ser la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Soomro y cols., 2002; Barefoot y Nettles, 1993; Castellano y cols., 2003). En la figura 6 se muestra el posible mecanismo de acción de las bacteriocinas.

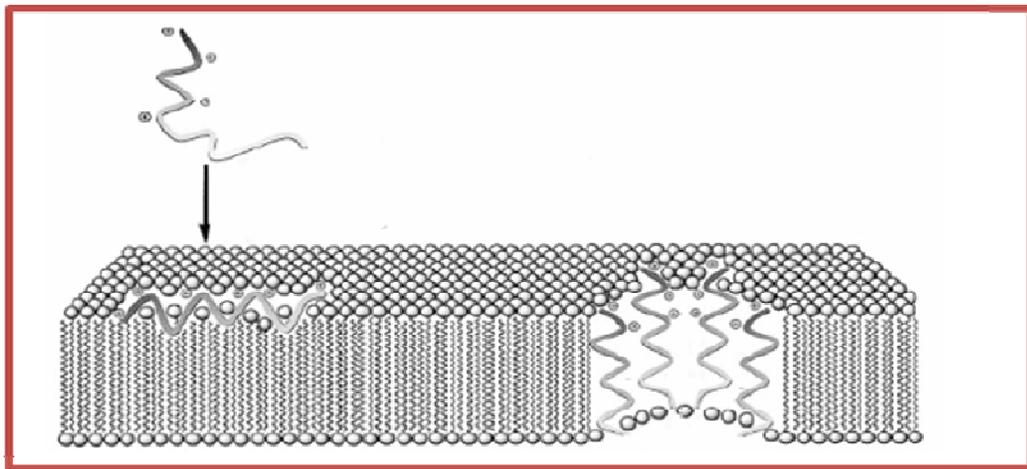


Figura 6. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por la formación de poros en la membrana bacteriana. Tomado: Ruiz-Larrea y cols., 2006.

Se ha observado que la Nisina y otros lantibióticos necesitan un estado energizado de las células para ejercer su acción, mientras que otras, como la pediocina PA-1, leucocina S, lactacina F, plantaricina C y las lactococinas A y B (Bruno y Monteville, 1993); actúan independientemente de la existencia de una diferencia de potencial a ambos lados de la membrana. Por otro lado, los lantibióticos no requieren un receptor proteico específico ya que actúan sobre liposomas (Barefoot y Nettles., 1993) Sin embargo, algunas bacteriocinas sólo son activas frente a células enteras y/o vesículas derivadas de las mismas, por lo que sí parecen necesitar un receptor localizado en la membrana o en la pared celular.

4.3 Bacteriocinas producidas por especies de *Lactobacillus*

El interés en las bacteriocinas producidas por especies de *Lactobacillus* se ha incrementado en años recientes debido a la aplicación potencial de *Lactobacillus* como bacterias iniciadoras para el proceso de fermentación de productos vegetales, cárnicos y marinos (Goktepe, 2006; Todorov y Dicks, 2007). Una gran variedad de bacteriocinas de especies de *Lactobacillus* han sido identificadas y poseen una potente actividad contra *L. monocytogenes* entre otros patógenos, descritas en la tabla 5. (Leroy y cols., 2005; Allende y cols., 2007; Ghrairi y cols., 2005; Lima y Filho, 2005; Deraz, 2007)

Tabla 5. Bacteriocinas producidas por especies *Lactobacillus* y su actividad contra patógenos

Bacteriocina	Fuente	Actividad Antimicrobiana
Sakacina A,M,P 674,K, y T	<i>L. sakei</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Lactocina 705	<i>L. casei</i> CRL705	<i>S.aureus</i> , <i>L.monocytogenes</i>
Curvacina A	<i>L.curvatus</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Curvacina 13	<i>L.curvatus</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Curvacina FS47	<i>L.curvatus</i>	<i>L.monocytogenes</i>
Plantaricinas BN,D, LP84, C19,C y F	<i>L. plantarum</i>	Algunas bacterias Gram-positivas y Gram negativas
Ácidofilina 801	<i>L. ácidophilus</i> IBB 801	Algunas bacterias Gram-positivas y Gram negativa
Pediocina Ach	<i>L. plantarum</i> ALC 01	<i>L.monocytogenes</i>
Buchnericina LB	<i>L.buchneri</i>	<i>L. monocitogenes</i> , <i>S.aureus</i> , <i>Bacillus spp</i> , <i>Pediococcus spp.</i> <i>Leuconostoc spp</i> , <i>Enterococcus</i> .
Reuterina	<i>L. Reuteri</i> .	<i>L.monocytogenes</i>

Tomado: Goktepe, 2006

4.4 Aplicación de Bacteriocinas de *Lactobacillus* en la bioconservación de alimentos.

La bioconservación es un método basado en el empleo de microorganismos, o de sus productos metabólicos, para inhibir o destruir microorganismos indeseables (Dolz, 2008; Neysens y cols., 2003). Las bacteriocinas son consideradas como bioconservadores naturales seguros debido a que se asume que ellas son degradadas por las proteasas en el tracto gastrointestinal (Allende y cols., 2007; Bernbom y cols., 2006), la utilización de bacteriocinas de *Lactobacillus* para el control de patógenos y su utilización como

bioconservadores en alimentos ha sido reportada por varios investigadores en años recientes, en la tabla 6 se resumen dichos reportes.

Tabla 6. Aplicación de Bacteriocinas de Lactobacilos como bioconservadores alimentarios.

Bacteriocina	Ejemplo de aplicación en alimentos	Actividad antagonista	Referencias
Pediocina AcH	Queso Muenster, embutidos,	<i>L.monocytogenes</i>	Loesner y cols., 2003
Sakacina A	Carne de puerco.	<i>L.monocytogenes</i>	Schillinger, 1991
Sakacina K	Embutidos fermentados	<i>L.monocytogenes</i>	Katla y cols., 2002.
Sakacina P	Salmon ahumado, embutidos de res , pollo	<i>L.monocytogenes</i>	Katla y cols., 2002
Reuterina	Embutidos de res	<i>L.monocytogenes</i>	Kuleasan y cols., 2002
Curvacina	Bistec de puerco	<i>L.monocytogenes</i>	Mauriello y cols., 2004
Plantaricina D	Ensalada lista para comer	<i>L.monocytogenes</i>	Franz y cols., 1998
Nisina	Encurtidos, quesos, lácteos,	<i>L. monocytogenes</i>	Loesner y cols., 2003

Modificado: Goktepe, 2006.

Entre las bacteriocinas más representativas a nivel de la industria alimentaria están la Nisina producida por *Lactococcus lactis* y la Pediocina PA.1/AcH producida por *Pediococcus acidilactici* son utilizadas en la industria Alimentaria. La Nisina y Pediocina PA.1/AcH son utilizadas en productos llamados Nisaplin™ y ALTA™. respectivamente (Deegan y cols, 2006; Soomro y cols., 2002; Bromberg y cols., 2004). La Nisina, descrita en 1928, fue la primera bacteriocina aislada a partir de *Lactococcus lactis subsp lactis*. Es la bacteriocina mejor caracterizada. Es un péptido de 34 aminoácidos y bajo peso molecular (inferior a 5 KDa), es una bacteriocina que exhibe un espectro amplio de actividad antibacteriana contra bacterias patógenas (*Listeria monocytogenes*) y deteriorativas presentes en los alimentos. Este péptido es inocuo, la única reconocida por la FDA con la categoría GRAS (Generally Recognized As Safe), es sensible a la digestión de proteasas y no produce cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos. Por estas razones ha sido utilizado como un bioconservador en alimentos (Guerra y cols., 2007b). La Nisina, fue probada por ser estable a pH fisiológico y tener alta susceptibilidad a la degradación enzimática. No requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica

de la célula. Su síntesis es compleja requiriendo procesos de transcripción, traducción, modificaciones post-traduccionales, secreción, procesamiento, y señales de transducción. Se produce de forma natural en algunos productos lácteos donde se utiliza como aditivo para prevenir la descomposición ocasionada por bacterias Gram positivas, especialmente *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria monocytogenes*. La Pediocina es producida por *Pediococcus acidilactici* se utiliza como conservador en productos vegetales y cárnicos y se ha observado una elevada actividad contra especies de *Listeria* por lo que tiene un alto potencial para ser utilizado como conservador en alimentos lácteos (Guerra y cols., 2007b). La aplicación potencial de bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus* para el control de patógenos en alimentos ha sido evaluada extensamente en el medio de cultivo y en modelos alimenticios. El uso de bacteriocinas en combinación con cultivos iniciadores del género *Lactobacillus* debería ser un método benéfico para la prevención de bacterias patogénicas y deterioradoras en productos alimentarios (Guerra y cols., 2007a; Bromberg y cols., 2004; Uteng y cols., 2002).

5. Género *Lactobacillus*

Los miembros del género *Lactobacillus* son ubicuos anaeróbicos, Gram-positivos, catalasa negativos no formadores de esporas incluye más de 25 especies (Vandamme y cols., 1996). Están presentes en el suelo, en el agua, en las plantas, en los animales, en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal, y en el tracto genital femenino (Lidbeck y Nord, 1991; Mitsuoka, 1992; Holzapfel, 2006). Los Lactobacilos, son aislados de una amplia variedad de alimentos y bebidas fermentadas (Hans y cols., 2002; Nout y Kiers., 2005; Onda y cols., 2002; Todorov y Dicks, 2005; Steinkraus, 2002; Powell y cols., 2007; Ampe y cols., 1999). Ellos juegan un papel predominante en la fermentación y desarrollo de sabor de muchos alimentos y bebidas tradicionales, características extensamente utilizadas en la industria de los alimentos; como iniciadores en productos lácteos, como queso y yogurt (Coudeyras y cols., 2008).

5.1 Fuentes de aislamiento de Lactobacilos

Los alimentos fermentados representan un tercio del total de consumo de alimentos en el mundo. Los alimentos fermentados pueden ser clasificados en

un gran número de maneras como: bebidas alcohólicas fermentadas por levadura, vinagre fermentado con *Acetobacter*, y principalmente: leche fermentada, encurtidos, vegetales, pescado, carne y cereales fermentados con *Lactobacilos* (Nout y Kiers., 2005). Una gran variedad de microorganismos especialmente *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, y *Lactobacillus* ya ha sido aislada de la fermentación espontánea de bebidas y alimentos fermentados tradicionales (Ampe y cols., 1999; Cervantes y Pedroza-Rodríguez, 2007), El pulque es una bebida fermentada tradicional de México obtenida por la fermentación del **aguamiel**, que es extraído de varias especies de maguey tales como *Agave atrovirens*, *A. americana*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, y *A. salmiana*, en el proceso de fermentación que inicia en el maguey participan microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias productoras de etanol, bacterias productoras de exopolisacaridos, y BAL, (Cervantes y Pedroza-Rodríguez, 2007).

5.2 Aguamiel

El aguamiel es un líquido fresco no fermentado de color blancuzco, ligeramente turbio, de olor a maguey, es rico en azúcares de fácil asimilación, que mantiene a ciertas poblaciones autóctonas en espera de las condiciones ambientales y nutricionales apropiadas para su propagación. La cantidad de aguamiel que produce el maguey varía de una planta a otra, durante los primeros días la producción es escasa pero va aumentando hasta llegar a alrededor de cinco litros por día. Después se inicia un descenso en la cantidad de líquido hasta que la planta muere. (Hinke, 2007). Se conoce que los agaves se han cultivado desde tiempos prehispánicos para la obtención del aguamiel, esta savia se extrae principalmente de *Agave atrovirens* y del *Agave mapisaga*. El aguamiel por lo tanto, constituye una fuente natural de azúcar, y es la principal materia prima para la producción de pulque, La población microbiana del aguamiel está compuesta fundamentalmente por levaduras tolerantes a la acidez, entre las que se encuentran *Zymomonas mobilis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter acetii*, *Bacillus terres*, *Lactobacillus buchneri*, *Leuconostoc dextranicum*, *Micrococcus candidus*, *M. Luteus*, *M. roseus*, *Sarcina flava*, además de levaduras como *Candida parapsilosis*, *Loeckera apiculata*, *Pichia membranaefaciens*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulopsis*

aguamellis. (Cervantes y Pedroza-Rodríguez, 2007). En el Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada (CIBA-TLAX) en un trabajo previo (Pérez, C. 2006), se seleccionaron cepas lácticas a partir de treinta y seis muestras de aguamiel, de las cuales se aislaron 22 cepas, en medio MRS modificado, se evaluó la capacidad de resistencia a ácido clorhídrico, a pH de 2.5, y la tolerancia a las sales biliares. Todas las cepas aisladas mostraron resistencia a ambas condiciones extremas, sin embargo, cuando se evaluó la capacidad antimicrobiana de las cepas aisladas por el método spot, 4 cepas denominadas, 8, 10, 17 y 22 mostraron una capacidad inhibitoria contra *Salmonella typhimurium*, *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las cuatro cepas seleccionadas, fueron indentificadas como *Lactobacillus para paracasei* con un porcentaje de confiabilidad del 85%, mediante análisis bioquímico y pruebas fundamentales como catalasa, oxidasa y tinción de Gram., las cuatro cepas demostraron capacidad para degradar fructanos, como la nistosa, además se evaluó la capacidad de resistencia a diferentes antibióticos como, Ampicilina, Tetraciclina, Trimetropin, gentamicina, sulfametoxazol entre otros. Los resultados indicaron que la cepa 8 es sensible a todos los antibióticos, no así, las cepas 22 y 17 que fueron resistentes a cuatro de los antibióticos. (Pérez, 2006).

5.3 Obtención y conservación de cepas de Lactobacilos

La conservación de cepas, es una herramienta esencial en la biotecnología, ya que es necesario contar con una fuente pura y viable del microorganismo de interés en cualquier bioprocesos, teniendo en cuenta, que los problemas de viabilidad y de pureza en los cultivos son frecuentes y comunes. Con el fin de evitar la pérdida de cualquier microorganismo tanto de interés industrial como de investigación, es necesario la implementación de un banco de células o abasto celular, el cual es definido como un “conjunto de alícuotas homogéneas de un cultivo microbiológicamente puro que se almacena bajo condiciones que garanticen la estabilidad y la viabilidad genética” (González, 2002). La ultra congelación es un método muy utilizado para la conservación de cepas, para congelar se usan sistemas frigoríficos como nitrógeno líquido (-192°C), hielo seco (-70°C) o bien el ultracongelador (-70°C). La congelación puede causar daños a las células que se pueden prevenir mediante el uso de crioprotectores

como el dimetil sulfóxido, glicerol o leche descremada (Giono y Castro, 2007). Existen muchos compuestos que se pueden utilizar como crioprotectores pero el que se utiliza con más frecuencia es el glicerol, a una concentración del 15% al 30% (v/v), estas sustancias protegen del daño que se pueda producir en las células microbianas en el momento de la congelación a temperaturas inferiores a 0°C. De esta forma, al no disponer de agua en estado líquido, las células permanecen en un estado inactivo metabólicamente, sin crecimiento (González, 2002).

5.4 Crecimiento de Lactobacilos

El crecimiento de *Lactobacillus* depende de factores, como temperatura, pH, actividad de agua, potencial redox, presencia de inhibidores como el ácido láctico, acético, etc. Las moléculas esenciales para el metabolismo celular, incluyen compuestos energéticos y bloques de construcción (aminoácidos, vitaminas, minerales, y nucleótidos), para la síntesis celular (Wee y cols., 2004). Los medios: Man Rogosa Sharpe (MRS), el medio M17 y caldo Elliker han sido desarrollados por ofrecer un buen crecimiento para Lactobacilos. Estos medios son utilizados para estudiar procesos de fermentación natural, cinéticas de crecimiento, y producción de metabolitos (Leroy y Vuyst, 2001; Rahim y Arbakariya, 2007). Sin embargo, pueden resultar costosos, Una de las posibles alternativas incluye la elaboración de medios a partir componentes obtenidos de fuentes agroindustriales residuales, tales como, suero de leche, melazas, soya etc. Se deben considerar algunos factores en la selección del medio de crecimiento como costos, habilidad para producir un gran número de células, el método de recuperación, así como, la producción de metabolitos. Se han desarrollado varias formas alternativas de analizar el crecimiento bacteriano cualitativamente y cuantitativamente. Una de los métodos más simples para estimar el tamaño de una población es por medio de la cuenta viable, el cual es un método indirecto para la determinación del número de bacterias presentes en gramo o ml de muestra, y otro es por medio de la estimación del peso de la biomasa celular, a veces, es más importante estimar la masa celular que el número, debido a que podemos conocer parámetros cinéticos en la industria de la fermentación, como la velocidad máxima de crecimiento.

5.5 Medios de cultivo para el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus*

Para el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus* se han utilizado diversos medios de cultivo y la selección de estos medios ha sido un elemento importante en las investigaciones sobre el potencial como microorganismos probiótico.

Oh y cols. (1995) con un medio a base de triptona-extracto de levadura, glucosa y tween 80, obtuvieron una biomasa de 8.423 g/L de *Lactobacillus casei* YIT 9018. Leroy y Vuyst. (1999) utilizaron un medio modificado al MRS convencional, con cloruro de sodio y nitrato de sodio para obtener 2.68 g/l de *Lactobacillus sakei* CTC 949 y produjeron una bacteriocina llamada Sakacina K. Leroy y cols. (2001) obtuvieron una biomasa máxima de 0.97 g/L para *Lactobacillus sakei* CTC 494 utilizando un medio con ingredientes simples con la adición de cloruro de sodio. Atrih y cols. (2001) con *Lactobacillus plantarum* C19 y el medio Elliker, obtuvieron una bacteriocina con un peso molecular de 3.8 Kda y una actividad total de 17,808 AU/ml. Dimitrijevic y Baras (2001). Utilizan un medio enriquecido con levadura de cerveza como componente extra a la fuente de nitrógeno, leche de soya, jugo de remolacha y jugo de zanahoria para *Lactobacillus sp.* V3, obteniendo una biomasa de 2.10g/l. Lechiancole y cols. (2002) utilizando un medio con extracto de levadura, triptona, sulfato de magnesio, peptona bacteriológica, ácido ascórbico, acetato de sodio y glucosa obtuvieron una biomasa de 9.23g/L para *Lactobacillus sakei* G20. Leal-Sánchez y cols. (2005) describen un medio modificado al MRS suplementado con cloruro de sodio y obtienen una máxima producción de bacteriocina de 3,200 AU/ml. Todorov y cols. (2004) utilizaron el medio MRS suplementado con sacarosa, lactosa, y una combinación de extracto de levadura-extracto de carne, como única fuente de nitrógeno para *Lactobacillus plantarum* ST13BR, y obtuvieron una actividad de bacteriocina de 6,400 AU/ml. Verluyten y cols. 2004 describen medios de cultivo a base de peptona bacteriológica, extracto de levadura, sulfato de magnesio, y manganeso y tween 80 para *Lactobacillus Curvatus* LTH 1174 alcanzando una biomasa máxima de 3.30 g/L y produciendo una bacteriocina de 2,700 AU/ml. Maldonado y cols. (2004) con *Lactobacillus plantarum* NC8 y medio M17 suplementado con 1% de glucosa y la adición de 10µg/ml de eritromicina

obtuvieron una bacteriocina denominada plantaricina NC8. Todorov y Diks. (2005) describen medios de cultivo con nutrientes de bajo costo como la leche de soya y melaza, para *Lactobacillus rhamnosus* alcanzando una biomasa de 3.45g/L. Obtuvieron dos bacteriocinas: ST461B2 y ST462B2 con una producción máxima de 12,800 AU/ml para ambas. Todorov y Dicks. (2005) describen diferentes medios de crecimiento suplementados con leche de soya, melazas, además de la adición de nutrientes orgánicos como la triptona, extracto de levadura, fructuosa, y glicerol, así como la suplementación de factores de crecimiento como la cianocobalamina, L-ascorbico, tiamina, y vitamina K para *Lactobacillus plantarum* ST194B2 alcanzando una biomasa de 2.30 g/L, obtuvieron dos bacteriocinas denominadas ST194B2 (a) y ST194B2 (b) con un peso molecular de 3.3 y 14 Kda respectivamente y una máxima producción de bacteriocina de 25,600 AU/ml. Vamanu y cols. (2005) con *Lactobacillus plantarum* y un medio enriquecido con peptonas y carbonato de calcio, obtienen una biomasa de 2.0 g/L. Delgado y cols. (2007) utilizando un medio con niveles reducidos de glucosa (0.2%) y componentes simples como fuente de carbono y nitrógeno obtuvieron después de 24 h una biomasa de 8.80g/l para *Lactobacillus Plantarum*. Zarate y Macías. (2006) describieron un medio llamado LAPTg con peptonas y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno y 1% de glucosa para *Lactobacillus ácidophilus* obteniendo una biomasa de 9.8g/L. Tobajas y cols. (2007) utilizaron el medio MRS con bactopectona, extracto de carne, extracto de levadura y acetato de sodio para *Lactobacillus reuteri* PRO 137 y obtuvieron una biomasa de 5g/l y una concentración de reuterina de 45.7 mM.

6. JUSTIFICACIÓN

En nuestro país se ha incrementado la elaboración y consumo de los alimentos funcionales, debido a la tendencia actual de los consumidores, de buscar alimentos que aporten un beneficio a la salud, más allá del aspecto nutritivo.

En México el aguamiel y pulque han sido reconocidos como bebidas saludables por siglos, sin embargo el cultivo del *agave atrovirens* y la producción de pulque han disminuido rápidamente en los últimos años. Su valor comercial se ha mermado significativamente, aunado a que no existe, un producto que en la actualidad utilice, con tecnología microbiana, cultivos derivados del aguamiel o del pulque con fines comerciales, por lo que las cepas probióticas que se aplican en la elaboración de alimentos funcionales son importadas, naturalmente aumentando el costo de producción y comercialización. En el presente estudio se ha planteado la utilización y selección de cepas autóctonas de aguamiel, evaluando su capacidad probiótica, mediante pruebas de capacidad antimicrobiana y ensayos de adherencia celular, así como la determinación de la viabilidad celular en medios de cultivo de bajo costo, con el fin de su posible aplicación a un producto alimentario, destinado en diferentes bebidas y alimentos para otorgarles un alto valor nutricional al menor costo.

7. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* para su uso en un alimento funcional.

7.1 Objetivos específicos

- Evaluar la viabilidad y sobrevivencia del cultivo de *Lactobacillus* durante el proceso de conservación con crioprotectores.
- Seleccionar y evaluar medios de cultivo para la obtención de mayor producción de biomasa.
- Determinar la viabilidad del cultivo de *Lactobacillus*.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana del sobrenadante del cultivo de *Lactobacillus* sobre *E.coli* O157:H7 y *Salmonella thypi*.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de las cepas de *Lactobacillus* sobre *E.coli* O157:H7 y *Salmonella thypi*
- Evaluar la adherencia de las cepas de *Lactobacillus* a la línea celular HeLa.
- Establecer los parámetros para la producción del cultivo probiótico a escala laboratorio.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Material biológico

Se utilizaron cepas de *Lactobacillus para paracasei* a partir de la colección de CIBA provenientes del Aguamiel extraídos del maguey especie *Agave atrovirens* originario de Zacatlán Puebla. En la tabla 7 se describen la cepas utilizadas, el género y la especie a la cual pertenecen, así como, la línea celular utilizada y la fuente de aislamiento.

Tabla 7. Procedencia del material biológico utilizado en la investigación.

Cepas	Género	Fuente de aislamiento	Lugar
8	<i>Lactobacillus para paracasei</i>	Aguamiel	CIBA-TLAX
10	<i>Lactobacillus para paracasei</i>	Aguamiel	CIBA-TLAX
17	<i>Lactobacillus para paracasei</i>	Agua miel	CIBA-TLAX
22	<i>Lactobacillus para paracasei</i>	Agua miel	CIBA-TLAX
EDL933 O157:H7	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica		ICUAP
<i>Salmonella</i>	<i>Salmonella entérica</i> <i>serovar typhi</i>		ICUAP

Línea celular	Fuente	Lugar
HeLa	Carcinoma de cáncer cervico-uterino.	E.N.C.B - IPN

8.2 Conservación y propagación de cepas.

Las cepas de *Lactobacillus para paracasei* se crecieron en caldo MRS a condiciones de anaerobiosis a 37°C de 24-48 horas. El cultivo se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se almacenó a -2°C para pruebas posteriores de actividad antimicrobiana y el paquete celular se resuspendió en medios de cultivo que contenían por un lado al agente crioprotector glicerol al 20% glicerol-80% medio MRS, (Oxoid) y por otro lado al otro medio que contenía el segundo agente crioprotector la leche descremada en polvo 20% leche descremada en polvo-80% medio MRS). Los viales se almacenaron a ultracongelación a -70°C.

8.3 Condiciones de cultivo para la determinación de viabilidad de las cepas.

Para determinar la viabilidad de las cepas en los dos crioprotectores, se descongelaron las 4 cepas de *Lactobacillus para paracasei* conservadas en los dos agentes crioprotectores cada 3 meses, Se determino la viabilidad por la técnica de conteo en placa por extensión en superficie, por triplicado, por medio de la siguiente metodología: Las cepas de *Lactobacillus para paracasei* se incubaron en caldo MRS, a 37°C de 24 a 48 h. en condiciones de anaerobiosis, se prepararon diluciones seriadas con buffer fosfatos sódico (PBS) se depositaron 100 µl de las diluciones: 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} , sobre la superficie de la placa agar MRS y se extendió uniformemente con una varilla de vidrio, y se incubaron a las mismas condiciones de crecimiento. Se contaron las colonias y se reportaron los resultados en UFC/ml. Para determinar la viabilidad de las cepas en los medios de cultivo seleccionadas para *lactobacillus*, se utilizo el mismo método de extensión en superficie por triplicado.

8.4 Selección y Evaluación de Medios de cultivo

Se busco en la literatura medios de cultivo para *Lactobacillus*, se seleccionaron 8 medios de cultivo reportados y se analizaron los siguientes parámetros: a) composición del medio de cultivo, b) Producción de biomasa, c) viabilidad celular y d) Actividad de bacteriocinas reportada en AU/ml. (Vamanu y cols., 2005; Zarate y Macias., 2006; Tobajas, 2007; Todorov y Dicks 2005a.,Todorov y Dicks,. 2005b, Dimitrijevi y Baras., 2001; Todorov y Dics; 2005; Leal-Sánchez, 2002. Se prepararon tres medios de cultivo a nivel matraz; dos seleccionados a partir de los medios analizados (Todorov y Dicks 2005a y Todorov y Dicks, 2005b) y el otro correspondiente al MRS convencional. (Oxoid). En la tabla 8 se describen los componentes de los dos medios seleccionados, y los parámetros: biomasa, composición y unidades de actividad bacteriocina AU/ml. reportados para estos medios, así como, el medio control MRS convencional.

Tabla 8. Medios de cultivo utilizados para *Lactobacillus*.

Componentes	g/L		
	MSB	MRS	MRS*
Glucosa	20	20	20
Triptona	20		12.5
Extracto de levadura		4	7.5
Leche de soya	100		
Peptona		10	
Fosfato ácido de potasio	5		2
Extracto de carne		8	
Acetato de sodio		5	
Citrato de amonio		2	
Sulfato de manganeso		0.2	
Tween 80		1	
Melaza	100		
Cianocobalamina			0.01
Sulfato de magnesio		0.2	
Biomasa	3.45	N.R	2.30
Composición	245	56.36	42
Unidades de actividad bacteriocinas	12,800AU/ml	N.R	25,600AU/mL
Costo (pesos M.N.)	\$ 54.56	\$ 103.68	\$ 50.56

N.R: No reportado

Preparación de la leche de soya: La leche de soya fue preparada a partir de granos de soya. Se molieron granos de soya con agua, la preparación se colocó en baño María a 60°C por 30 min. Se ajustó el pH a 6.5 y la solución se filtró con una gaza varias veces. Para la posterior adición al medio de cultivo. (Dimitrijevic y Baras, 2001).

Tratamiento de la Melaza: Teniendo en cuenta que la melaza es un residuo de la industria azucarera y que tienen impurezas y contaminantes en su composición, se realizó un pretratamiento en el cual se centrifugó tres veces y se esterilizó a 20 lb de presión durante 20 min para inhibir la microbiota acompañante.

Se realizó una cinética de crecimiento de la cepa 22 en el medio seleccionado MSB en base a los parámetros evaluados como; viabilidad, biomasa, unidades de actividad de la bacteriocina, Se tomaron muestras de cultivo cada 2 h. durante 72 h.

8.5 Determinación de peso seco (biomasa)

Para la determinación de peso seco se elaboraron charolas de aluminio de un área de 6 x 6 cm², se pesaron en una balanza (peso inicial) (Marca Acculab, LA-200) y se colocaron en una estufa (Marca Buekerl modelo 107905) a 50°C hasta peso constante (peso final).

Por otro lado se crecieron las cuatro cepas de *Lactobacillus para paracasei* en cada uno de los medios a probar MSB, MRS y MRS* (seleccionados en base al análisis realizado). Los cultivos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, se guardó el sobrenadante a -20°C para pruebas posteriores de actividad antimicrobiana y el paquete celular se lavo dos veces con agua destilada, después se resuspendió en 1 ml de agua destilada y se colocó en las charolas, éstas, se pesaron antes y después de colocarlas en la estufa de 50°C, hasta peso constante (Peso final) (Modificado de Hoek y cols., 1999).

8.6 Evaluación de la Capacidad antimicrobiana del sobrenadante y el cultivo.

Para realizar el ensayo de evaluación de la capacidad antimicrobiana del sobrenadante, se crecieron las cuatro cepas de *Lactobacillus* en los tres medios MRS, MRS* y MSB, los cultivos obtenidos se centrifugaron a 10,000 rpm, durante 10 min. Los sobrenadantes obtenidos se ajustaron a pH 6 con 1 N de NaOH, y se depositaron 30 µl de éstos sobre cada una de las placas con las cepas patógenas, sembradas en masivo: *Salmonella thypi* y EHEC O157:H7, previamente inoculadas y crecidas por separado, en tubos de ensayo con caldo TSB (caldo soya tripticaseína) a 37°C por 24 h. Las placas se incubaron a 37°C, en condiciones de aerobiosis por 24 h. y se midió el halo de inhibición (modificado de Wen-Hsin y cols., 2006). Para realizar el ensayo de evaluación de la capacidad antimicrobiana del cultivo, se crecieron las cuatro cepas de *Lactobacillus* en caldo MRS, se depositó 5µl del cultivo en placas con medio MRS y se crecieron, por otro lado las cepas patógenas se vertieron sobre las placas con el cultivo de *Lactobacillus*, las placas se incubaron a 37°C, en condiciones de aerobiosis por 24 h. y se midió el halo de inhibición

8.7 Adherencia a cultivos celulares

El método utilizado para el ensayo de adherencia fue de acuerdo al descrito por Crociani y cols (1995) y Sarem y cols (1996). Células HeLa se incubaron a 37°C una presión parcial de 5% CO₂ y 95% de aire, utilizando un medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 15% de suero bovino fetal, hasta observar la monocapa o confluencia celular. Las células fueron usadas después de tres días de incubación hasta que alcanzaron un estado de confluencia celular. Las células fueron lavadas dos veces con solución salina de fosfatos PBS y se disgregaron las células con el complejo tripsina-EDTA. Se transfirieron a una microplaca de 24 pozos conteniendo cada pozo medio de cultivo para tejidos. (Gibco). La mezcla se mantuvo a 37°C a una presión parcial de 5% CO₂ y 95% aire, hasta que crecimiento celular de la monocapa alcanzara el 70-80% de confluencia celular. Por otro lado se crecieron las cepas de *Lactobacillus para paracasei* en caldo MRS a condiciones de anaerobiosis a 37° C se adicionaron 100 µl del cultivo de *Lactobacillus* a las microplacas y se incubó a 37°C a condiciones de anaerobiosis por 6 h se fijo con metanol frío los cubreobjetos con las células HeLa y los *Lactobacillus*, y se tiñeron las preparaciones con el colorante Giemsa y se observó al microscopio. (Marca Olimpos BX51) (Crociani y cols; 1995; Sarem y cols; 1996).

El Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM), que provee nutrientes básicos a las células, ya sea que se encuentren en solución o ligados a proteínas, favoreciendo o estimulando el crecimiento celular, los factores de adhesión y propagación en los cuales se proporciona el transporte de hormonas, vitaminas y lípidos. Se emplea de manera generalizada una adición al 10% (v/v) de suero fetal bovino inactivado (SFB), con el fin de destruir inmunoglobulinas que puedan llevar a la lisis celular. Adicionalmente este medio debe ser suplementado con L-Glutamina, que es un aminoácido esencial para las células en cultivo, además debe suplementarse con antibióticos como Penicilina y Estreptomicina, que eviten contaminación microbiana. (Fresney, 1990).

8.8 Determinación del ácido láctico por el método de acidez titulable.

Se midió 1 ml de muestra en un vial y diluyó agregando 9 ml de agua destilada hasta obtener un volumen de muestra de 10 ml. Se midió el pH inicial de la muestra y se añadió una gota de solución de fenolftaleína al 1% y se tituló con Hidróxido de sodio 0.1 N hasta la aparición de un color rosado que persistía de

15 a 30 segundos. Se determinó el pH final de la muestra. Los resultados se reportaron en g/L. En donde la acidez en la muestra expresada como ácido láctico se calcula con la siguiente fórmula:

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

En donde:

V= Volumen de solución de hidróxido de sodio 0.1N gastado en la titulación de la muestra, en ml.

N= Normalidad de la solución de hidróxido de sodio.

M=Volumen de la muestra en cm^3 .

NOTA: un ml de NaOH 0.1N es igual a 0.0090 g de ácido láctico.

90= peso molecular del ácido láctico.

8.9. Determinación de glucosa y ácido láctico por el analizador bioquímico YSI.

Durante la cinética de fermentación de *Lactobacillus*, se tomaron las muestras del cultivo a diferentes tiempos, los sobrenadantes se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 min, se diluyeron 1:1 en agua destilada estéril. Se determinó la cantidad de glucosa y ácido láctico por el analizador bioquímico, basado en enzimas inmovilizadas lactasa. Los datos obtenidos se reportaron en g/ L.

8.9.1 Determinación de la velocidad específica de crecimiento (μ)

La velocidad específica de crecimiento (μ) se determinó Rx por diferenciación numérica mediante la siguiente fórmula:

$$Rx_2 = \frac{x_3 - x_1}{t_3 - t_1}$$

$$\mu = rx/x$$

En donde:

X= Biomasa

T= Tiempo

8.9.2 Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis estadístico con Prueba t student, para muestras suponiendo varianzas iguales, en el paquete estadístico Microsoft Excel con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$. Los datos se graficaron en el programa Origen 6.1.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1 Evaluación del efecto de los crioprotectores sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus*.

En la figura 7 se muestran los recuentos celulares realizados cada 3 meses de las cepas crioconservadas, para evaluar el efecto de los dos agentes crioprotectores: glicerol y leche descremada, sobre la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus* en función del tiempo, como puede observarse, el recuento de bacterias fue mayor cuando las cepas fueron crioconservadas en glicerol que cuando se conservaron en leche descremada.

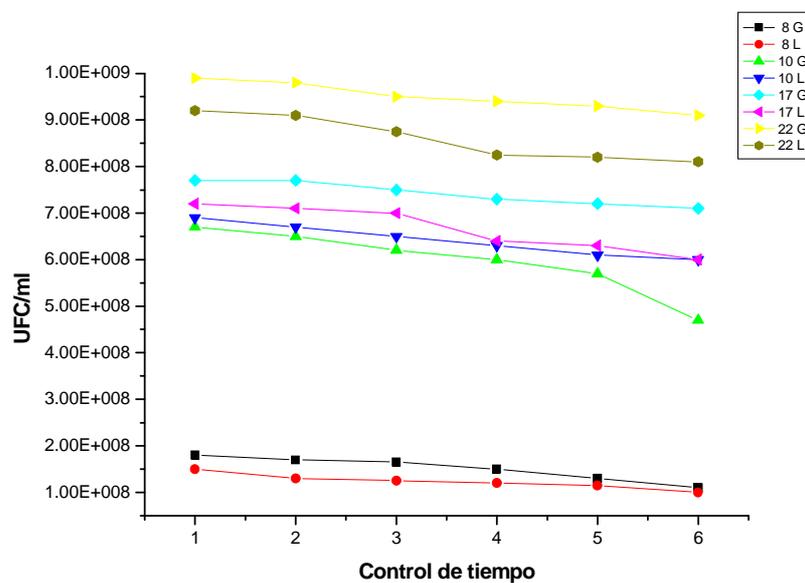


Figura 7. Recuento celulares de las cepas de *Lactobacillus* conservados en los dos crioprotectores: G: Glicerol, L: leche en polvo, en función del tiempo.

Al observar los resultados presentados en la figura anterior se aprecia que la viabilidad de la cepa 22 conservada en glicerol se mantiene casi constante, sin embargo la misma cepa cuando es conservada en leche en polvo hay un decaimiento notable a partir de la cuarta fase de descongelamiento correspondiente a las 12 meses de crioconservación, En la cepa 17 se observa el mismo efecto de los crioprotectores pero a diferencia de que el decaimiento se observa a partir de la tercera fase de descongelamiento, correspondiente a 9 meses de crio conservación. La viabilidad de la cepa 10, conservada en glicerol se mantiene casi constante, sin embargo cuando la cepa fue crecida en leche en polvo decayó drásticamente en la fase 6, correspondiente a 18 meses de

congelación, la cepa 8 se mantuvo constante en los dos agentes crioprotectores. Esta diferencia puede explicarse debido a él glicerol al ser un agente estabilizante altamente hidrofílico que permea la pared y la membrana celular microbiana con lleva a que este crioprotector forme enlaces con el agua intracelular y de esta forma disminuya el efecto soluto, impidiendo de esta forma la muerte celular (Voget, 2005), en cambio la leche descremada al contener proteínas como la caseína, y la lactoglobulina le confieren la característica de ser un crioprotector semipermeable ya que forman entre la pared y la membrana celular una capa que protege la célula del daño mecánico, sin embargo, esto también significa que protege solamente a la pared y no, a la membrana celular debido al impedimento estérico de las proteínas, lo cual es un factor que probablemente este disminuyendo el recuento de las cepas de *Lactobacillus*. En la industria alimentaria en donde se enfoca este trabajo se debe tener en cuenta varios criterios al intentar seleccionar el mejor agente crioprotector, se deben considerar ciertos aspectos como: reducción del daño a las células, no debe ser tóxico, debe ser altamente permeable, y de fácil penetración en la membrana celular y por lo tanto debe ayudar a disminuir los efectos agresivos de la congelación (Marín, 2003). El glicerol, se ha utilizado como agente crioprotector para Lactobacilos por lo que se da una mayor prioridad a la utilización de este crioprotector aunque un crioprotector derivado de fuentes naturales como la leche descremada, podría ser muy atractivo, ya que cumple con los criterios descritos anteriormente, además,. La disminución de la viabilidad entre los periodos de tiempo, se debió probablemente, al cambio brusco de temperatura que tuvieron las cepas afectando la viabilidad debido a que al utilizar a los dos crioprotectores inicialmente a una temperatura de -70°C y luego pasar a -20°C se formaron cristales, los cuales posiblemente dañaron la pared celular de las células, por lo tanto, se recomienda que las variaciones de la temperatura sean rápidas tanto para la congelación, como para la descongelación. En la industria alimentaria aún existen varios problemas con respecto a la baja viabilidad de probióticos en alimentos lácteos y otros; la micro encapsulación es una posible solución para incrementar la viabilidad de los probióticos durante el proceso de manufactura y su paso a través del tracto gastrointestinal (Anal y Singh, 2007).

9.2 Selección de Medios de cultivo para el crecimiento y producción de bacteriocinas por cepas de *Lactobacillus*

Se realizó una búsqueda de varias referencias bibliográficas sobre medios de cultivo reportados para Lactobacilos, así como, nutrientes específicos que permitieron el crecimiento o recuperación de especies de *Lactobacillus*. Los componentes presentes en los medios de cultivo, pueden influir de manera significativa en el potencial probiótico y las características siguientes: viabilidad, biomasa, capacidad de producir sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas (Vamanu y cols., 2005; Zarate y Macias, 2006; Tobajas, 2007; Todorov y cols., 2004; Dimitrijevi y Baras, 2001; Todorov y Dicks, 2005a; Todorov y Dicks, 2005b, Leal-Sánchez, 2002). El análisis realizado, se puede sintetizar en la tabla 9, en la cual se muestran los componentes de cada medio, la biomasa, las unidades de actividad de bacteriocina (AU/ml) y la composición. Los reportes de Todorov y Dicks 2005 (ab) describen valores de biomasa entre 3.45 y 2.30 g/L; valores de unidades de actividad entre 12,800 y 25,600 AU/ml; y una composición de 42.01 y 245 g/L. Por lo que se seleccionaron dichos reportes para realizar dos formulaciones de medios de cultivo denominándolos MSB, y MRS* (medio MRS modificado). El medio MRS (marca, Oxoid) se tomó como control ya que es el medio que más se ha utilizado en el crecimiento de los Lactobacilos, existen reportes que este medio produce un gran número de células viables (Oh y cols., 1995). Sin embargo, el medio MRS es un medio costoso, con componentes complejos. En la tabla 10 se comparan cada uno de los componentes de los medios formulados, así como, el costo por litro de estos, podemos notar que los medios MSB y MRS* tienen costo por litro de \$54.56 y \$ 50.56 respectivamente, Costos significativamente menores en comparación al Costo del MRS estándar que fue de \$103.68. Resulta evidente que los componentes obtenidos de fuentes agroindustriales como la Melaza, suero de leche le confieren al medio la característica de ser altamente atractivos para el desarrollo de probióticos a nivel industrial, ya que lo que se busca en la industria de la fermentación es obtener los mismos beneficios al menor costo.

Tabla 9. Composición de medios de cultivo elegidos para *Lactobacillus* reportados en la literatura.

COMPONENTES g/L	MEDIO MRS OXOID	Vamanu y cols., 2005	MEDIO LAPTg Zarate y Macias 2006	Tobajas, 2007	*MSB Todorov y Dicks., 2005 (b)	Dimitrijevi y Baras., 2001	MRS * Todorov y Dics., 2005 (a)	Leal-Sánchez, 2002
Peptona	10	10	10			10		10
Extracto de levadura	5		10	4		5	7.5	4
Extracto de carne	10			8		5		
glucosa	20	20	10	20	20	20	20	20
Fosfato di potásico	2					2	2	2
Citrato de amonio dibásico	2			2		2		1.84
Acetato de sodio	5			5		5		
Sulfato de mg	.0.58			.200		.1		0,2
Sulfato de Mn	.0.28			.5		.5		0.04
Tween 80	1		1	1				1
L-Cisteina	0.5							
CaCO ₃	1	1						
Triptona			10		20		12.5	
Melaza					100			
bactopectona				10				
Fosfato ácido de potasio				2	5			2
Leche de soya					100	50		
Jugo de zanahoria						50		
Jugo de remolacha						50		
cianocobalamina							0.01	
Lab- lemco						100		8
Levadura de cerveza								
Biomasa g/L	-	-	2	5	3.45	2.10	2.30	2.35
UFC/ml	-							
Composición g/L	56.36	31	41	52.7	245	219.6	42.001	39.081
Unidades de actividad Bacteriocina	5,200 AU/ml	-	-		12,800AU/mL		25, 600AU/mL	3,200 AU/ml;

Tabla 10. Evaluación de costos de medios de cultivo para *Lactobacillus* seleccionados en este estudio.

Composición	MSB	MRS	MRS*
Glucosa	20 g	20 g	20 g
Triptona	20 g		12.5 g
Extracto de levadura		4 g	7.5 g
Leche de soya	100 g		
Peptona		10 g	
Fosfato ácido de potasio	5 g		2 g
Extracto de carne		8 g	
Acetato de sodio		5 g	
Citrato de amonio		2 g	
Sulfato de manganeso		0.2 g	
Tween 80		1ml	
Melaza	100 g		
Cianocobalamina			1.0 mg
Sulfato de magnesio		0.2 g	
Biomasa	(3.45 g/L)	N.R	2.30 g/L
Composición	245g	56.36 g	42.g
Unidades de actividad bacteriocinas	12,800AU/ml	N.R	25,600 AU/mL
COSTO (pesos M.N.)	\$ 54.56	\$ 103.68	\$ 50.56

N.R: No reportado

En la tabla 11 se muestra el costo por litro del medio de cultivo MSB y de cada uno de los componentes del medio en M.N, podemos observar que la Melaza tiene un Costo de \$0.16. a pesar de tener un costo muy bajo contiene aproximadamente el 50.0% (w/w) de azúcares, la sacarosa es el compuesto mayoritario con un 35.9 %, la fructuosa al 5.6 %, la glucosa al 2.6%, la dextrosa al 11.5%, proteína cruda al 6.30% como fuente de nitrógeno, algunos oligoelementos como el calcio, fierro, cobre, zinc, etc como factores de crecimiento necesarios para el metabolismo celular de un microorganismo (Wee y cols., 2004).

Tabla 11. Costo por litro de cada uno de los componentes del medio **MSB**.

Componente	Gramos/litro	Costo por litro M.N	Costo Total por litro M.N
Glucosa	20	2.80	\$ 54.56
Triptona	20	46.76	
Leche de soya	100	2.00	
Fosfato ácido de potasio	5	2.84	
Melaza	100	0.16	

En la tabla 12 se muestra el Costo total por litro y por componente del medio MRS (Oxoid) Como se puede observar, los componentes del medio representan un alto costo siendo las peptonas los que aumentan el Costo y producen una desventaja para la producción de los microorganismos a gran escala. El medio Man Rogosa- Sharpe (MRS) (tabla 12), ha sido desarrollado para ofrecer un buen crecimiento para Lactobacilos, (Leroy y Vuyst, 2001).

Tabla 12. Costo por litro de cada uno de los componentes del medio MRS.

Componente	Gramos/litro	Costo por litro \$ M.N	Costo total /litro
Peptona	10	38.5	\$103.68
Extracto de carne	10	44.0	
Extracto de levadura	5	5.5	
K ₂ HPO ₄	2	1.113	
Citrato de amonio	2	1.87	
Glucosa	20	2.8.	
Tween 80	1	0.8	
Acetato de sódio	5	1.87	
Mg SO ₄ . 7H ₂ O	0.58	2.84	
MNSO ₄ . 4 H ₂ O	0.28	1.50	
- cisteina	0.5	2.89	

En la tabla 13 se muestra el costo por litro del medio MRS*, así como, de cada uno de los componentes presentes en el medio en M.N. Lo que podemos resaltar de los componentes es la presencia de la vitamina cianocobalamina la cual es un factor de crecimiento para los Lactobacilos, Todorov y Dicks., en 2005 a, reportó que al crecer Lactobacilos con esta vitamina se obtiene un valor de 25, 600 UA/ml de bacteriocinas, lo que resulta altamente atractivo para considerar este componente y utilizarlo en la producción de Lactobacilos.

Tabla 13. Costo de cada uno de los componentes del medio MRS* por litro

Componente	Gramos/litro	Costo por litro \$ M.N	Costo total M.N
Glucosa	20	2.8	\$50.56
Triptona	12.5	29.25	
Extracto de levadura	7.5	9.5	
Fosfato de potasio	2	1.113	
Cianocobalamina	0.001	7.9	

Debido a esto se plantea que fuentes económicas de carbono y nitrógeno pueden ser encontradas en la forma de desechos industriales o subproductos. Ejemplos son las melazas, soya, suero hidrolizado, suero de queso y jarabe de licor de maíz (Guerra y cols; 2001; Hofvendahl y Hahn-Hagerdal, 2000; Oh y cols; 2005; Wee y cols; 2004). Uno de los factores más importantes de buscar en una fuente de carbono industrial es el tipo de carbono presente. La fuente de carbono debería estar en concentraciones suficientes según lo que se quiera producir. Además de considerar si el medio favorece la producción sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas, en el medio MSB formulado con melaza, se adicionó este compuesto debido a que Todorov, y Dicks., 2005(b) reporta hasta 12800 UA/ml, en un medio adicionado con este compuesto, lo que nos motivo a incluirlo en el medio MSB

9.3 Comparación del crecimiento de *Lactobacillus* en los medios utilizados (Viabilidad y biomasa).

Se evaluó el efecto de los tres medios de cultivo sobre el crecimiento de las cuatro cepas de *Lactobacillus*. En la figura 8 y 9 se muestra la comparación entre el número de bacterias viables y la biomasa celular de las cuatro cepas, de *Lactobacillus para paracasei* crecidas en los tres medios de cultivo MSB, MRS y MRS*

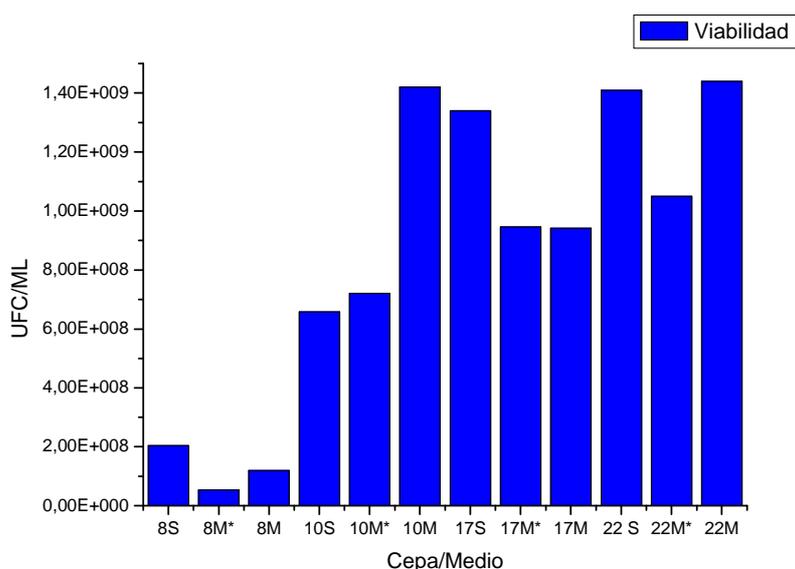


Figura 8. Recuento del número de microorganismos de *Lactobacillus* viables, expresado en UFC/ml. UFC/ml de las cepas crecidas en los medios MSB (S), MRS (M) y MRS* (M*).

*

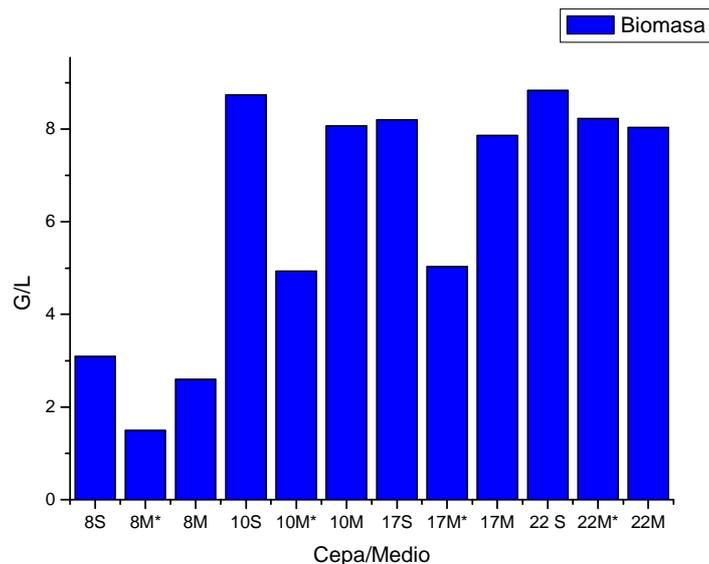


Figura 9. Biomasa producida por *Lactobacillus*, expresada en g/L. Se muestran los valores del peso seco de cada una de las cepas (8, 10, 17 y 22), obtenido después del crecimiento en los medios de cultivo MSB (S), MRS (M) y MRS* (M*).

El medio MSB fue el más adecuado para el crecimiento de las cepas, comparado con los demás medios evaluados en orden decreciente: MRS y MRS*. El medio de cultivo MSB favoreció el crecimiento de todas las cepas de estudio en especial la de la cepa 22, la cual alcanzó un recuento máximo de 14.4×10^8 UFC/ml, y de 8.833 g/L, la cepa 17 alcanzó un recuento de 13.4×10^8 UFC/ml y 8.2g/L, valores muy superiores a los alcanzados por la cepa 8 en el mismo medio que fueron de 2.04×10^8 UFC/ml y 3.1 g/L. La respuesta óptima de crecimiento de las cepas mostrada en el medio MSB, esta soportada debido a que el medio MSB tiene la mayor concentración de nutrientes: 245 g/L comparada con una concentración de nutrientes de 56.36 y 42 g/L para MRS y MRS* respectivamente. Sin embargo, el crecimiento es parecido a pesar de la gran diferencia en las concentraciones de cada medio. Aunque también se especula podría deberse al aporte de nutrientes obtenidos de la melaza y la leche de soya, Dado que la melaza de caña es un componente con una alta concentración de carbohidratos y además contiene compuestos tales como, calcio, magnesio, fósforo y potasio, que son indispensables para el funcionamiento celular. Además, los azúcares del medio pudieron incrementar significativamente el crecimiento, número y peso

de los Lactobacilos, así como, su capacidad de producir ácidos orgánicos, etc., Esta hipótesis, es apoyado por Verluyten y cols., 2004, quien reportó que altas concentraciones de nutrientes, permitieron mejorar el crecimiento de *L. curvatus* LTH 1174, así como, la obtención de una alta concentración de biomasa y una alta actividad de bacteriocina en el sobrenadante, con la lenta producción de ácido láctico. Se sabe, que el crecimiento de *Lactobacillus* es a menudo inhibido, no solo por la producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico y en algunos casos ácidos acético), sino también a la limitación de nutrientes. Este hecho, puede explicar el porqué las diferencias en cuanto a viabilidad y biomasa del las cepas en comparación a los otros medios que como se observa en la figura 8 y 9, el medio MRS* es el que presenta un recuento menor entre un rango de 0.532×10^8 UFC/ml a 10.5×10^8 UFC/ml y valores de biomasa de 1.5 g/L a 8.23 g/L Debido a la complejidad de los requerimientos nutricionales resulta confuso saber cuáles compuestos son precisamente responsables de la limitación del crecimiento celular en el medio MRS*, una posible explicación al bajo recuento celular en este medio, según reportes, de Lechiancole y cols., en 2002, se encontró que la triptona utilizada en combinación con otras fuentes de nitrógeno como el extracto de levadura, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *L. sakei* así también se ha encontrado que, la interacción de extracto de levadura y peptona puede resultar en una disminución del crecimiento cuando ambos factores están presentes en alta concentración, debido sobre todo a la composición y longitud promedio de los péptidos derivados de fuentes de nitrógeno. Estas diferencias entre péptidos, dan como resultado una competición entre estos di-, tri- y oligopéptidos derivándose en una limitada captación de los péptidos esenciales y aminoácidos por parte de los microorganismos, observando como resultado una limitación del crecimiento microbiano. Aunado a esto, se debe considerar el medio de cultivo que estimule o favorezca la producción del número de microorganismos vivos más alta, así como, la producción de biomasa, en el menor tiempo posible. El Costo de los sustratos a menudo representa la mayor parte del costo de producción de cultivos microbianos de interés en la industria alimentaria (Juárez y cols., 2002). Es importante tener en cuenta estos parámetros para la

selección de un medio de cultivo adecuado para el crecimiento y producción de microorganismos con potencial biotecnológico.

9.4 Evaluación de la capacidad antimicrobiana de las cuatro cepas de *Lactobacillus*

En varios estudios, se ha reportado que los probióticos incluyendo los géneros de *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, y *Enterococcus* entre otros, y pueden inhibir el crecimiento de un amplio número de bacterias patógenas por diferentes mecanismos como la producción de sustancias inhibitorias como el peróxido de hidrógeno, ácido láctico y bacteriocinas (Piyawan y cols., 2006).

Este efecto antagónico se pudo comprobar en este trabajo al evaluar en primera instancia la capacidad antimicrobiana de los cultivos de *Lactobacillus* en medio MRS contra cepas indicadoras de *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhi*. Se observa en la tabla 14 y figura 10, que las cepas patógenas mostraron halos de inhibición mayor a 5 mm, lo que evidencia la capacidad de los Lactobacilos para inhibir bacterias patógenas. Las cepas 8,17, 22 de *L. para paracasei* inhibieron el crecimiento de ambas cepas indicadoras (*Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella typhi*), mientras que la cepa 10 solo inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi*. Los resultados obtenidos con respecto a la actividad antimicrobiana de los probióticos en general, demuestran la capacidad que tienen los cultivos probióticos de eliminar y competir contra ciertos patógenos intestinales, de ahí el gran potencial que representan para la industria alimentaria.

Tabla 14. Capacidad antimicrobiana de *Lactobacillus para paracasei* crecido en medio MRS contra *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC) cepa O157:H7 y *Salmonella*

CEPA	8	22	10	17	INHIBICIÓN
EHEC	++	++	+	++	SENSIBLE
<i>Salmonella typhi</i>	++	++	++	++	SENSIBLE

Halos de inhibición: - menos de 1 mm, + de 2 a 5 mm, ++ de 5 mm en adelante

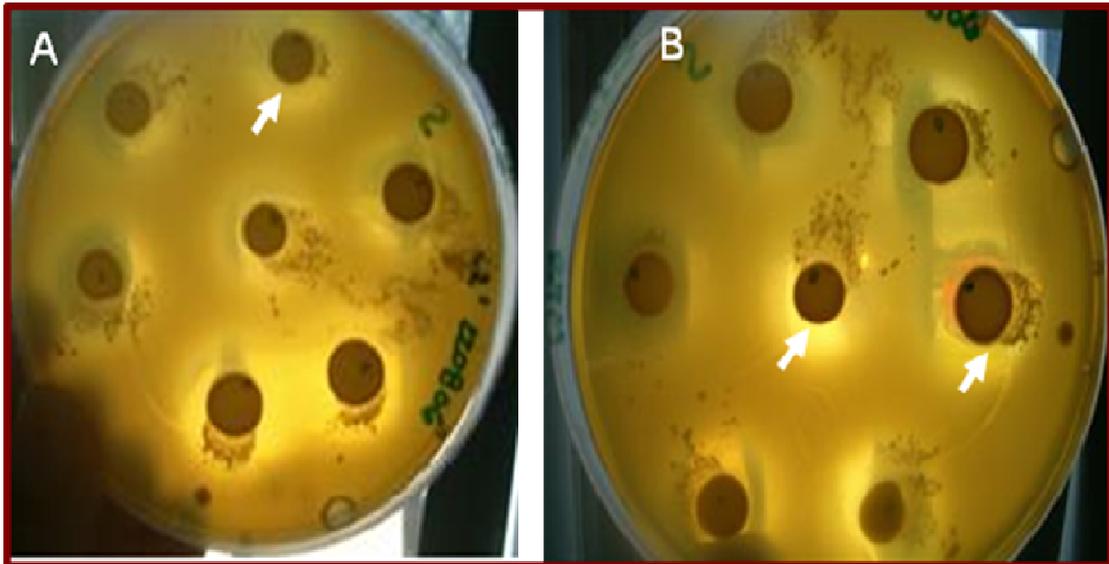


Figura 10. Actividad antagonista de las cepas de *Lactobacillus para paracasei* expresada mediante los halos de inhibición de las cepas indicadora O157:H7 y *Salmonella typhi*. **A.** Halos de inhibición de EHEC en medio MRS. **B.** Halos de inhibición de *Salmonella* en medio MRS.

Se realizó un segundo ensayo de antagonismo con la finalidad de evaluar la capacidad de los sobrenadantes de los cultivos crecidos en los tres medios, sobre los mismos microorganismos patógenos (*Salmonella thypi* y EHEC O157:H7). Ensayos similares se han realizado en otros artículos en donde se ha reportado que el sobrenadante libre de células de cepas de *Lactobacillus* inhibe el crecimiento de EHEC O157:H7 y *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococos mundti*, *Listeria innocua* entre otros patógenos, debido a la presencia de sustancias presentes en el sobrenadante como las bacteriocinas (Todorov y cols., 2004; Powell y cols., 2007).

En la tabla 15, y figura 11 se muestran los resultados del ensayo de la capacidad antimicrobiana del sobrenadante correspondientes al cultivo de las cepas 8, 10, 17, 22 crecidas en los tres medios de cultivo MRS*, MRS, y MSB contra *Salmonella* y EHEC O157:H7

Tabla 15. Halos de inhibición del sobrenadante de cultivos de *Lactobacillus* sobre *Salmonella typhi* y EHEC O157:H7

Cepa	Medio	<i>Salmonella entérica serotipo Typhimurium</i>	EHEC O157:H7
8	MRS*	-	-
8	MRS	+	+
8	MSB	-	+++
10	MRS*	-	-
10	MRS	+	+
10	MSB	-	+++
17	MRS*	-	+
17	MRS	+	+
17	MSB	-	+++
22	MRS*	+++	-
22	MRS	+	+
22	MSB	++	+

Halos de inhibición en mm. (-) menor de 1 mm (no sensible), (+) de 2 a 5 mm y (++) de 5 mm en adelante (sensible).

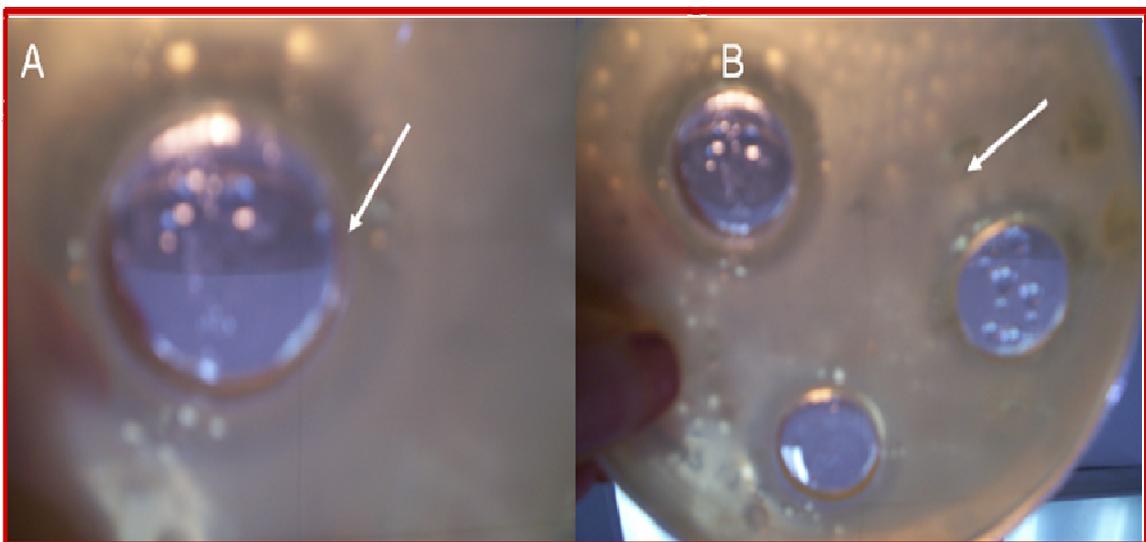


Figura 11. Actividad antagonista de los sobrenadantes de *Lactobacillus para paracasei* **A.** Se observa el halo de inhibición de la cepa indicadora EHEC O157:H7. **B.** Se observan los halos de inhibición de *Salmonella typhi*.

En tabla 15, se muestra que el sobrenadante correspondiente a la cepa 8 de *Lactobacillus* crecida en el medio MRS, el cual inhibió el crecimiento de EHEC

O157:H7 y *Salmonella thypy*. Las cepas 8,10 y 17, crecidas en medio MSB, inhibieron fuertemente a EHEC O157:H7, en comparación con el sobrenadante obtenido del cultivo en los otros medios MRS y MRS*. La cepa 22 en el medio MSB, presentó una actividad antimicrobiana mayor contra las dos cepas patógenas. Lo que la convierte en la cepa candidata para utilizarla en el desarrollo de probióticos, así como, al medio MSB. En el caso de la cepas 8, 10, y 17 crecidas en medio MSB inhibieron el crecimiento de EHEC pero no de *salmonella* debido a que el medio MSB quizá favorece la expresión de una posible bacteriocina específica para EHEC, y ésta, no tiene efecto sobre *Salmonella*. Los resultados de inhibición de la cepa 22 mostraron que la cepa crecida en el medio MRS*, inhibió el crecimiento solo de *Salmonella*, por lo que se puede pensar es que este medio favorece la expresión de una posible bacteriocina específica para esta enterobacteria, en cambio la misma cepa pero crecida en medio MSB inhibió el crecimiento de ambas cepas patógenas, por lo que se postula que el medio quizás está favoreciendo la expresión de dos posibles bacteriocinas con actividad antimicrobiana para las cepas patógenas. En base a los resultados mostrados anteriormente podemos decir que el medio de cultivo, está influyendo en la producción diferencial de bacteriocinas y la actividad antimicrobiana contra las cepas patógenas, de acuerdo a los resultados en cuanto a las diferencias tan grandes en cuanto a crecimiento de las cuatro cepas y en base a los resultados obtenidos en este ensayo se sugiere que probablemente no es la misma especie de *Lactobacillus*. Por otro lado la posible producción de bacteriocinas es fuertemente dependiente del pH inicial del cultivo, de los nutrientes y la temperatura de incubación (Hassan y cols., 2006). Los niveles de actividad de bacteriocinas han sido correlacionados con la masa celular o la velocidad de crecimiento. El aumento del nivel de producción de bacteriocinas es a menudo obtenido en condiciones de estrés, cuando los nutrientes se encuentran limitados. La producción de bacteriocinas parece depender del crecimiento y actividad fisiológica de la cepa productora. De hecho, la mayoría de las bacteriocinas que se han estudiado hasta el momento presentan una cinética de metabolito primario y, en consecuencia, su producción está correlacionada con el aumento de la biomasa. Por otro lado, el control del pH a lo largo de la fermentación puede resultar en títulos más altos de actividad (De Vuyst y

Vandame, 1994). Sin embargo, en otros estudios se reporta la producción de bacteriocinas sobre medios complejos y sustratos residuales (Hassan y cols., 2006). Esta dependencia es debido a la calidad y cantidad natural de la fuente de nutrientes de los medios, que en sí mismo, provoca valores de pH finales diferentes que también determinan el rendimiento de bacteriocinas. Medios de cultivo complejos de alto costo han sido utilizados para la producción de bacteriocinas, pero un medio de cultivo de bajo costo a partir de fuentes de carbono y nitrógeno económicas como la melaza y la soya es una alternativa para la producción de estos compuestos antimicrobianos. Se han reportado altos niveles de actividad de bacteriocinas hasta de 6, 400 AU/ml cuando las cepas de *Lactobacillus* crecen en presencia de triptona, extracto de carne o extracto de levadura, como única fuente de nitrógeno o una combinación (relación 1:1). El óptimo nivel de K_2HPO_4 para la producción de bacteriocina se encontró entre 0.2% y 0.5%. La presencia de 2.0 % de glucosa resulto en una producción de hasta 3,200 AU/ml para la cepa de *Lactobacillus* ST13B3, la adición de cianocobalamina y tiamina en el medio favorecieron una actividad máxima de 6400 AU/ml (Todorov y cols., 2004). El incremento en la actividad de las bacteriocina, podría ser debido al metabolismo de los nutrientes remanentes o componentes del medio no requeridos para el crecimiento celular, la producción de plantaricinas es estimulada por la glucosa y sacarosa (Powell y cols., 2007). La producción de bacteriocinas de BAL se ve favorecida en medios que contienen cantidades significantes de péptidos nitrogenados con peso molecular en el rango de 3000 a 6000 Da. En algunos casos el aumento de nutrientes no ocasiona un aumento en la producción de bacteriocinas Se piensa que las BAL, no producen más, debido a que existe una inhibición por parte del producto final de su metabolismo. Las condiciones óptimas de producción deben ser determinadas para cada organismo y la concentración máxima de bacteriocina parece depender de la especie y aún de la cepa. La hipótesis más aceptada sobre cómo las bacteriocinas desestabilizan las membranas es que, en función de su carácter catiónico, éstas serían inicialmente atraídas electrostáticamente por la superficie celular (las bacteriocinas se adsorben inespecíficamente a células sensibles, a resistentes y a las propias células productoras) (Barefoot y Nettles, 1993). Posteriormente, bien por la presencia de un determinado

potencial de membrana (lantibióticos) o por la interacción con un receptor específico o no, adoptarían una conformación tal que les permitiría agregarse entre sí formando aglomerados que se reordenarían para dar lugar a una especie de cilindro hueco (poro) que atravesaría la matriz membranal, manteniendo las zonas hidrofílicas hacia la parte interior del poro (Barefoot y Nettles., 1993; Oscáriz y Pisabarro, 2001). A pesar de que no hay evidencia física de estos poros, los resultados de numerosos experimentos apoyan esta hipótesis frente a la desestabilización de la membrana mediante una acción de tipo detergente. Además, las bacteriocinas pueden formar láminas β y hélices α anfipáticas, estructuras asociadas a proteínas que interactúan con la membrana plasmática y que abren poros en la misma (Castellano y cols., 2003).

En general, los poros son inespecíficos y permiten la salida de cualquier soluto intracitoplasmático, únicamente limitado por el tamaño. No obstante, en algunas ocasiones, como ocurre con la lactococina G, el poro generado es específico para iones K^+ (Castellano y cols., 2003; Rojas y Vargas, 2008). Se ha demostrado que la nisina activa las autolisinas de la pared, predominantemente en el área de formación del septo y que la acción complementaria de las lactococinas A, B y M provoca la lisis celular en *L. lactis*, en contra de lo que ocurre con cada una por separado (Barefoot y Nettles, 1993). Los efectos anteriormente mencionados se han observado en estudios con microorganismos específicos. Por ejemplo la cepa RC14 de *Lactobacillus reuteri* produce una sustancia surfactante que reduce la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal de *Clostridium difficile*, patógeno oportunista intestinal. Así mismo la cepa CRL-431 de *Lactobacillus casei* ha reducido microorganismos patógenos del intestino, como cepas enterotoxigénicas de *E. coli*, *Listeria monocitogenes*, *Shigella sunnei* y *Salmonella typhimurium* tanto en estudios *in vitro* como en animales *in vivo* (Figueroa y cols., 2006).

9.5 Evaluación de la capacidad de adherencia de cepas de *Lactobacillus* a la línea celular HeLa

],

[La adhesión bacteriana a las células intestinales es considerada uno de los criterios más importantes para la selección de cepas probióticas. La adhesión

y colonización de bacterias probióticas en el colon es un requerimiento esencial para el beneficio a la salud.

En la figura 12, se muestra la adherencia de la cepa 8 y EHEC O157:H7 (Control positivo), sobre células HeLa, así como, las células HeLa como control negativo.

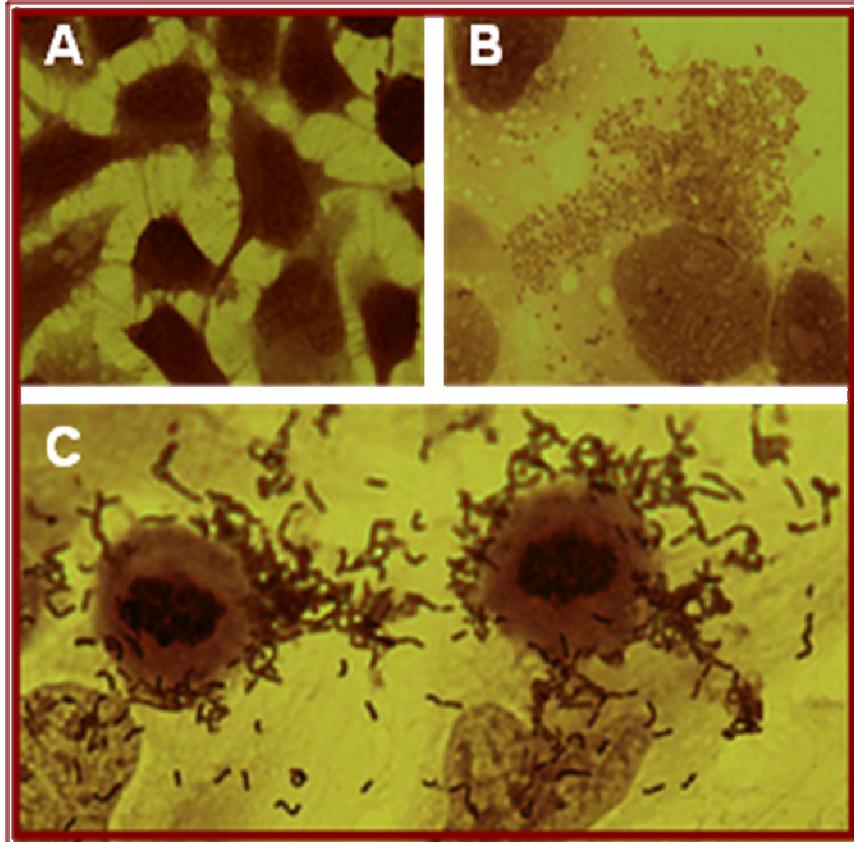


Figura 12. Adherencia de la cepa 8 y E.coli a células HeLa. A. Células HeLa. B, Adherencia agregativa de EHEC O157:H7 (control positivo). C, Adherencia localizada de la cepa 8 cultivada en medio SB. Resolución 100x (Olympus BX51).

Las células HeLa sin infectar, fijadas con metanol y teñidas, control negativo de adherencia (Fig12A) presentan una morfología característica de células HeLa normales, sin presentar pérdida del material citoplasmático, o algún daño a las células por el tratamiento llevado a cabo sobre ellas. En la figura 12C observamos la adherencia de la cepa 8 cultivada en medio MSB sobre las células HeLa, los Lactobacilos se adhieren de manera uniforme en agregados o empalizados sobre la superficie de las células, esto corresponde a un patrón que se conoce como patrón agregativo el cual ha sido reportado en *E. coli* por Sansonetti y cols., 1986, donde describe tres patrones de

adherencia a células HEp-2 (agregativo, localizado y difuso) y por Páez y cols., 2000, quienes describen un patrón de adherencia agregativo y difuso para cepas de *K. pneumoniae* y *K. oxytoca*, (Martínez y cols., 2002) a si también Zepeda-López y González-Lugo, en 1995. Describieron tres patrones distintos de adherencia a líneas celulares: Adherencia Localizada (AL), en el cual la bacteria invade y forma microcolonias en distintas regiones de la superficie, Adherencia difusa (AD) en el cual la bacteria se adhiere eventualmente a la superficie celular y adherencia agregativa (AggA), en el cual agregados de bacterias invaden la célula en arreglos empalizados. Por otro lado el patrón agregativo presentado en la cepa EHEC O157:H7, (**fig. 12B**) mostro una buena definición por parte de la cepas al formar conglomerados en algunas zonas de las células HeLa, característicos de este patrón de adherencia. En la figura 13 observamos la adherencia de la cepa 8 cultivada en los tres medios de cultivo: MRS, MRS* y MSB (figura 13B, 13C, 13D respectivamente) y, se muestra el control positivo de EHEC O157:H7 (fig. 13A).

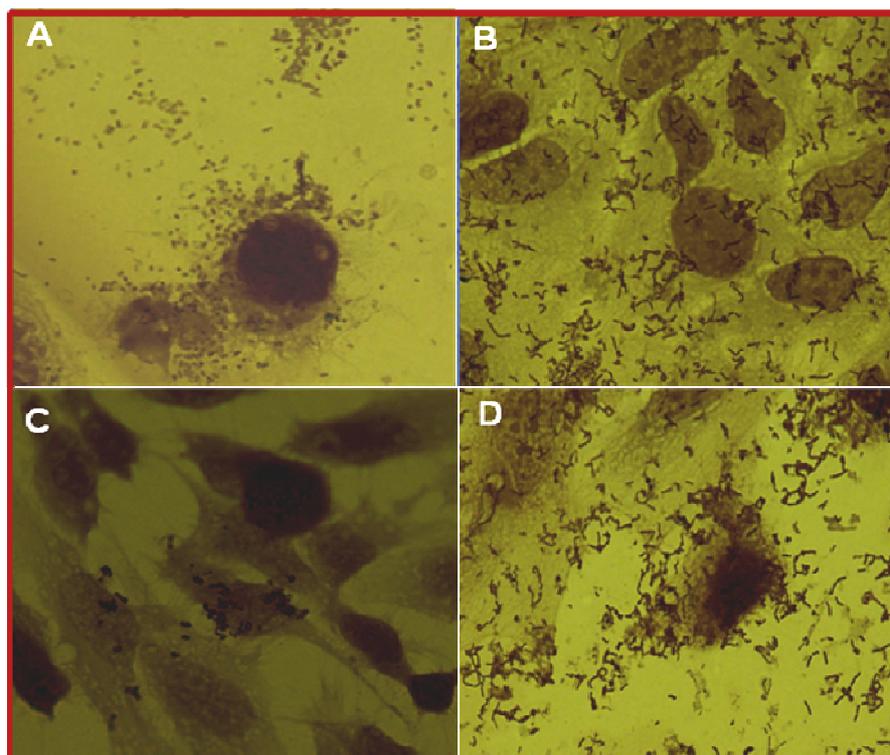


Figura 13. Adherencia de la cepa 8 de *Lactobacillus para paracasei* en los tres medios sobre células HeLa. A. Control positivo de EHEC O157:H7 (adherencia agregativa). B, Adherencia difusa (medio MRS). C. Adherencia localizada (MRS*). D. Adherencia agregativa (medio MSB). Resolución 100x (Olympus BX51)

La cepa 8 se adhiere de manera diferente cuando se cultiva en los medios, MRS y MRS* , como se observa en la figura **13B y 13C** , la cepa 8 cultivada en medio MRS presento un patrón de adherencia tipo difuso, lo que significa que se adhieren eventualmente a la superficie celular, lo cual no es recomendable debido a que se requiere que la cepa permanezca por un tiempo más definido para que cumpla con la característica probiótica., a diferencia de lo que observamos en la figuras **13C y 13D** correspondiente a la cepa crecida en medio MRS* y MSB respectivamente, donde se observa un patrón de adherencia tipo agregativo, cabe destacar en la figura **13D**, se observa que existe un mayor número de microorganismos adheridos a las células HeLa, En general, se puede especular que la capacidad de adherencia de la cepa 8 está relacionada con la composición de los medios de cultivo, lo cuál podría ser sustentado por otras investigaciones como la de Schâr-Zammaretti y cols., 2005, donde se reporta que las estructuras de superficie de los microorganismos determinan la capacidad de adherencia y es dependiente de las condiciones de crecimiento y la composición del medio de fermentación. Como consecuencia, las interacciones de una cepa específica con el epitelio gastrointestinal o con las superficies de un alimento durante los bioprocesos, pueden depender de la composición del medio de fermentación y las condiciones de crecimiento. Sin embargo, se tienen pocos conocimientos sobre la relación entre las condiciones de fermentación y cambios en las estructuras de superficie bacteriana y sus efectos sobre la interacción bacteria-célula. Sin embargo se han realizado cambios en las estructuras de superficie realizando pequeñas variaciones en la formulación de los medios comerciales, usando varias fuentes de carbono, o variando la concentración de un carbohidrato simple en un medio complejo contando con componentes como el extracto de levadura, extracto de carne, concentrados lácteos, y peptonas (Schâr-Zammaretti y cols., 2005).

Por otro lado, Servin A y Coconnier concluyeron que el mecanismo de adhesión de probióticos puede estar dado por interacciones electrostáticas, hidrofobicas, fuerzas estéricas, y estructuras específicas, sin embargo aun no está del todo claro. (Farid y cols., 2008). Sin embargo se conoce que la

presencia de subunidades proteicas arregladas bidimensionalmente (capa S), sobre la superficie de *Lactobacillus* explica probablemente la adhesión al intestino. La capa S de *Lactobacillus* ha mostrado interactuar con receptores sobre células epiteliales del huésped, y por lo tanto bloquea sitios receptores sobre la mucosa superficial para la adherencia de especies patógenas. Se tiene conocimiento, que la capa S confiere hidrofobicidad a la superficie celular de *Lactobacillus*, sin embargo las cepas con lipopolisacáridos (LPS), no necesariamente se adhieren mejor a los sustratos de las cepas hidrofóbicas sin SLP y un cambio de la superficie celular hidrofóbica fue reportada para *L. ácidophilus* ATCC4356 and *L. casei* ATCC393 al aumentar la fuerza iónica.

Se ha observado que cultivos de cepas de *L. casei* ATCC393 crecidos bajo condiciones hiper-osmóticas mostraron una hidrofobicidad significativamente mayor que en cultivos controles que en primera instancia resultaron mas hidrofílicos. Esto sugiere que los glicolípidos presentes en la membrana envolvente están relacionados con el aumento de la hidrofobicidad de la superficie celular inducida por fuerza iónica externa del medio. Además, se ha reportado que algunas especies de *L. ácidophilus* también son sensibles a la fuerza iónica de los cambios de la permeabilidad de las propiedades de la membrana de la célula y, por tanto, con un probable impacto sobre las propiedades físico-químicas de la superficie celular bacteriana. Por lo tanto, estos estudios sugieren que la superficie celular de *Lactobacillus* puede adaptarse a hidrofobicidad de superficie celular en respuesta a los cambios del medio ambiente con un probable efecto potencial sobre el comportamiento de su adhesión. (Vadillo y cols., 2005). Las proteínas de la capa S pueden diferir marcadamente incluso entre especies relacionadas y pueden representar hasta el 10-15% del contenido proteínico total de una célula. Dependiendo de la especie, la capa S puede tener un grosor entre 5 y 25 nm y todos los poros tienen un diámetro idéntico comprendido entre 2 y 8 nm. Esto puede explicar porque la misma cepa se adhiere de manera distinta a la superficie de las células HeLa.

En la figura 14 observamos la adherencia de la cepa 10 cultivada en los tres medios de cultivo: MRS, MRS* y MSB (figura 14B, 14C, 14D

respectivamente), y en la figura 14 A, se muestra el control positivo de EHEC O157:H7.

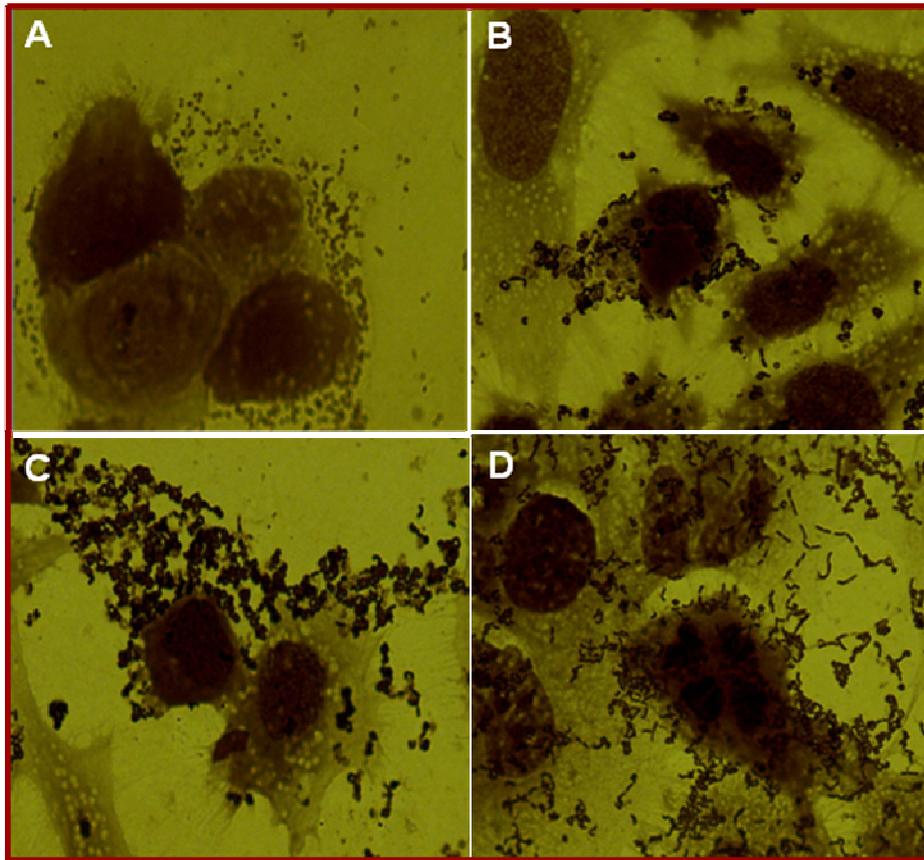


Figura 14. Adherencia de la cepa 10 de *Lactobacillus para paracasei* en los tres medios sobre células HeLa. A. Control positivo de EHEC O157:H7 (adherencia agregativa). B, Adherencia agregativa (medio MRS). C. Adherencia agregativa (MRS*). D. Adherencia agregativa (medio MSB). Resolución 100x (Olympus BX51)

Como puede observarse esta vez, los tres medios están favoreciendo la adherencia agregativa de la cepa 10, sin embargo, el número de Lactobacilos adheridos es diferente como se observa en la figura **14B**, la cepa 10 cultivada en medio MRS presentó un patrón de adherencia tipo agregativo, observándose una menor cantidad de Lactobacilos unidos a las células, a diferencia de lo que observamos en la figuras **14C y 14D** correspondiente a la cepa crecida en medio MRS* y MSB respectivamente, donde se observa un mayor número de Lactobacilos adheridos, cabe destacar que el medio MSB está favoreciendo la capacidad de adherencia (figura **14D**). En general podemos concluir que el medio MSB favorece la adherencia agregativa de la

cepa 10, y el número de microorganismos adheridos sería de gran potencial en el desarrollo de un probiótico comercial.

En la figura 15, observamos la adherencia de la cepa 17 cultivada en los tres medios de cultivo: MRS, MRS* y MSB (figura 15B, 15C, 15D respectivamente), también, se muestra el control positivo de EHEC O157:H7. (Fig. 15A)

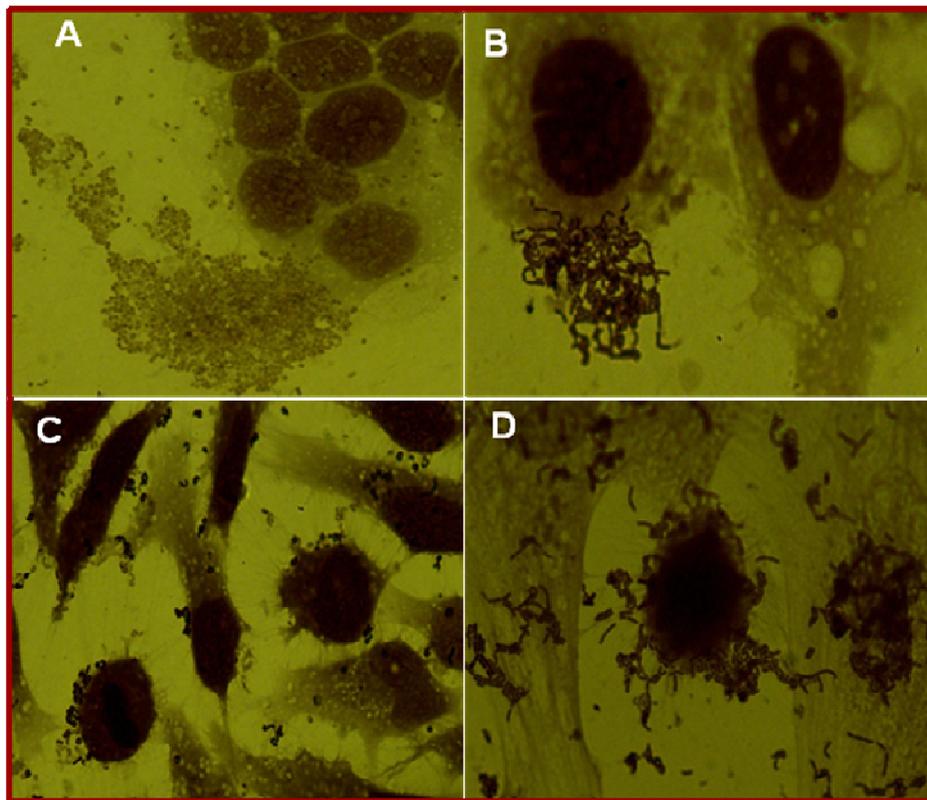


Figura 15. Adherencia de la cepa 17 de *Lactobacillus para paracasei* en los tres medios sobre células HeLa. A. Control positivo de EHEC O157:H7 (adherencia agregativa). B. Adherencia localizada (medio MRS). C. Adherencia agregativa (MRS*). D. Adherencia agregativa (medio MSB). Resolución 100x (Olympus BX51)

La cepa 17 crecida en medio MRS* y MSB, correspondientes a las figs. **15 C** y **15D** respectivamente presentan el mismo patrón de adherencia agregativo, sin embargo, podemos notar que hay diferencias en cuanto al grosor y longitud de los microorganismos, por lo que sugerimos que probablemente no se trata de la misma especie de *Lactobacillus*, habría que realizar pruebas de identificación molecular para confirmar esto. La cepa 17 cultivada en medio MRS (figura **15B**) presentó un patrón de adherencia localizada, y los Lactobacilos son más largos, esta vez también cabe destaca que existe un

mayor número de *Lactobacillus* adheridos a células HeLa, cuando la cepa es crecida en medio MSB, y se concluye que la capacidad de adherencia de la cepa 17 se ve favorecida por la composición del medio de cultivo.

En la figura 16 se muestra la capacidad adherente de la cepa 22 crecida en los 3 medios MRS, MRS* y MSB, (Figura 16B, 16C y 16D respectivamente), así como, el control positivo de EHEC O157:H7 se puede observar en la fig. 16 A

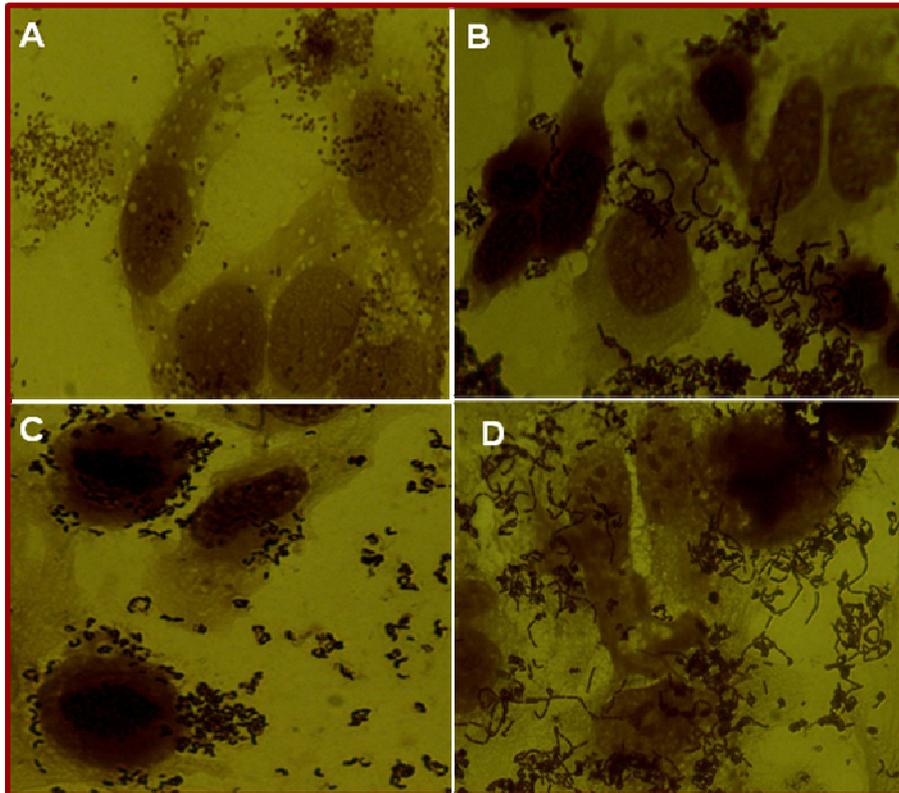


Figura 16. Adherencia de la cepa 22 de *Lactobacillus para paracasei* en los tres medios sobre células HeLa. A. Control positivo de EHEC O157:H7 (adherencia agregativa). B. Adherencia agregativa (medio MRS). C. Adherencia agregativa (MRS*). D. Adherencia agregativa (medio MSB). Resolución 100x (Olympus BX51)

La cepa 22, presentó el mismo patrón de adherencia agregativa en los medios evaluados (**fig. 16 B, C, y D**), en el medio MRS se observan muy pocos Lactobacilos adheridos a las células HeLa, a diferencia del número observado en los medios MRS* y MSB, los cuales favorecen un mayor número de Lactobacilos adheridos a las células, probablemente a que estos medios estén favoreciendo la expresión de estructuras de superficie. De manera general podemos concluir que la capacidad de adherencia de la cepa 22, se observa mejor cuando es crecida en el medio MSB. La pared celular

de microorganismos Gram-positivos como los Lactobacilos está compuesta de peptidoglicano, recubierta por lípidos, proteínas de superficie y polisacáridos aniónicos y neutrales. Las proteínas de capa S son de interés particular para *Lactobacillus* porque cubre la pared celular en arreglos bidimensionales. Los componentes de los medios de cultivo posiblemente están modificando las estructuras de superficie, como proteínas, exopolisacáridos y ácidos lipoteicos presentes en la pared celular de las bacterias, estas estructuras, contribuyen a las propiedades de adherencia y deberían tomarse en consideración para el proceso de adhesión al tracto gastrointestinal. (Schâr-Zammaretti y cols., 2005). En la figura 17 se muestran los controles de células, en la fig.17 A podemos observar la adherencia positiva de EHEC que corresponde a una adherencia agregativa, y en el panel B, C y D se observan las células HeLa solamente con el medio de cultivo MRS, MRS* y MSB respectivamente, se muestra que no hay un efecto citopático de los componentes del medio sobre las células HeLa.

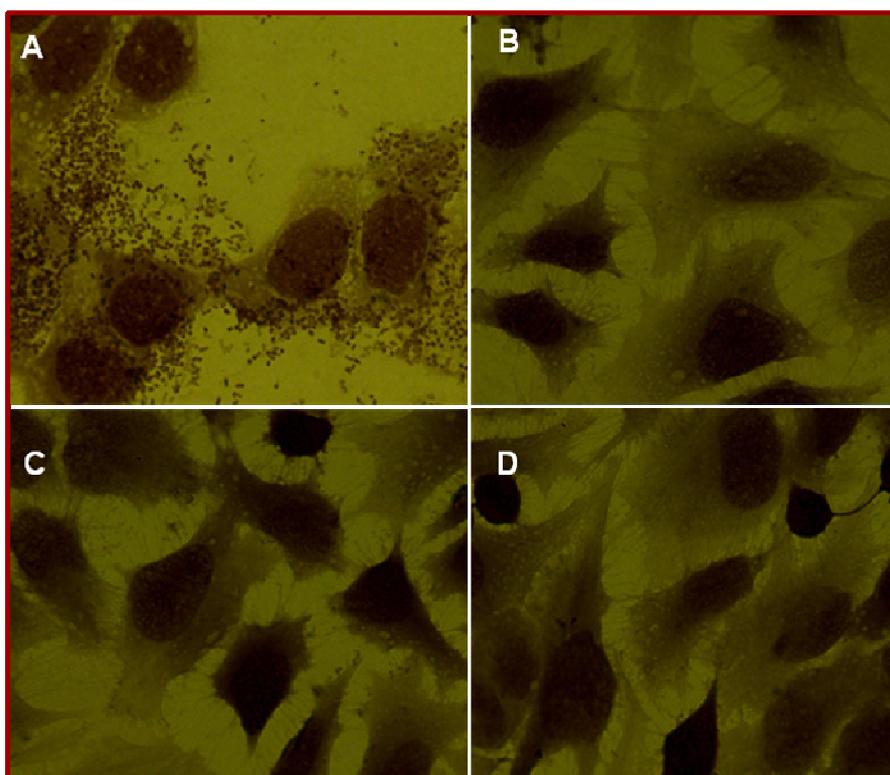


Figura 17. Adherencia control. A. Se muestra el control positivo de EHEC O157:H7 B. se observan las células HeLa con el medio MRS. C. Se observan las células HeLa con el medio MRS *. D. Se observan las células HeLa con el medio MSB. Resolución 100x (Olympus BX51).

Este ensayo se realizó con la finalidad de evaluar el efecto de los tres medios de cultivo sobre las células HeLa, como puede observarse que el medio no está modificando la morfología de las células. Es importante tomar en cuenta que otros investigadores han encontrado que productos comerciales que contienen Lactobacilos, éstos no se adhieren o se adhieren débilmente al epitelio intestinal humano (Wen-Hsin y cols., 2006), y la función probiótica se ve reducida. Por lo tanto, es de gran importancia, que las cepas de estudio hayan presentado la habilidad de adherirse a líneas celulares y esto podría verse reflejado en la capacidad de *L. para paracasei* para adherirse a la superficie de células intestinales, colonizar el tracto gastrointestinal humano e iniciar los mecanismos involucrados en evitar el establecimiento de bacterias patógenas, (Wen-Hsin y cols., 2006).

Por lo tanto, la adherencia es un factor clave que se refiere a la colonización de algunos sitios específicos y la sobrevivencia de microorganismos en diferentes hábitats que depende de su habilidad para adherirse a varias superficies o capas. Los procesos de adherencia involucran una interacción entre moléculas complementarias sobre la superficie del microorganismo (adhesinas) (Barbu y Balotescu, 2007). La adherencia del patógeno puede también inhibirse por el impedimento estérico, donde un gran número de bacterias beneficiosas puede cubrir sitios del receptor de una manera específica, o compitiendo por receptores específicos, que estarían de otra manera disponibles para los patógenos. Varias especies probióticas, tales como *L. salivarius*, *L. gasseri*, *L. acidophilus*, han demostrado capacidad de inhibición contra la adherencia del crecimiento de *H. pylori*, en un modelo gástrico en célula epiteliales (García y cols., 2007). Por otra parte, varios probióticos pueden inhibir la adherencia de microorganismos patógenos modificando el estado del glicosilación del receptor en células epiteliales usando el factor soluble excretado por los probióticos. Varias bacterias probióticas previenen y reparan la mucosa inhibiendo el daño a las proteínas de ensamble. Los probióticos previenen la unión del patógeno a las proteínas cito esqueléticas de las células epiteliales, funcionando, así como, una barrera en la mucosa previniendo la secreción de electrolitos (García y cols., 2007)

En el medio MSB se presentaron los mejores resultados en cuanto a: obtención de biomasa y recuento bacteriano de cepas de *Lactobacillus*, capacidad antagónica de las cepas hacia *E.coli* O157:H7 y *Salmonella*, capacidad de adherencia de tipo agregativa de las cepas a líneas celulares. Hela y la cepa 22 crecida en este medio, fue elegida por cumplir con las características para ser considerada como un probiótico, ya que resulto ser la que tuvo mayor crecimiento, y su sobrenadante resulto tener mayor capacidad antimicrobiana contra los patógenos evaluados además se confirmo su potencial probiótico descrito por Pérez, 2006. Por tal motivo, se realizó la cinética de crecimiento para evaluar los parámetros realizados con anterioridad, además de conocer la producción de ácido láctico y el consumo de glucosa.

9.6 Cinética de crecimiento de la cepa 22 en el medio MSB

Para caracterizar los procesos de fermentación se evalúan los siguientes parámetros: viabilidad, biomasa, producción de ácido láctico, velocidad máxima de crecimiento (μ máx.) que tienen influencia en la optimización del cultivo a escala industrial. En la figura 18, se muestra la comparación entre los parámetros evaluados durante la cinética: viabilidad, biomasa, ácido láctico producido, glucosa consumida y pH en condición estacionaria y en agitación. En la figura 18 A, se muestra la Comparación del recuento de Lactobacilos con la biomasa alcanzada, bajo condición estacionaria. En la figura 18 B se muestra la comparación de Lactobacilos con la biomasa alcanzada en condiciones de agitación. En la figura 18C se muestra la relación entre el recuento de Lactobacilos, la glucosa consumida y el ácido láctico producido bajo condición estacionaria. En la figura 18D se compara el recuento de Lactobacilos, la glucosa consumida y el ácido láctico producido bajo condiciones de agitación. En la figura 18 E, se muestra la comparación entre el recuento de Lactobacilos con el pH alcanzado durante condición estacionaria. En la figura 18 F, se muestra la comparación entre el recuento de Lactobacilos con el pH alcanzado durante condición de agitación.

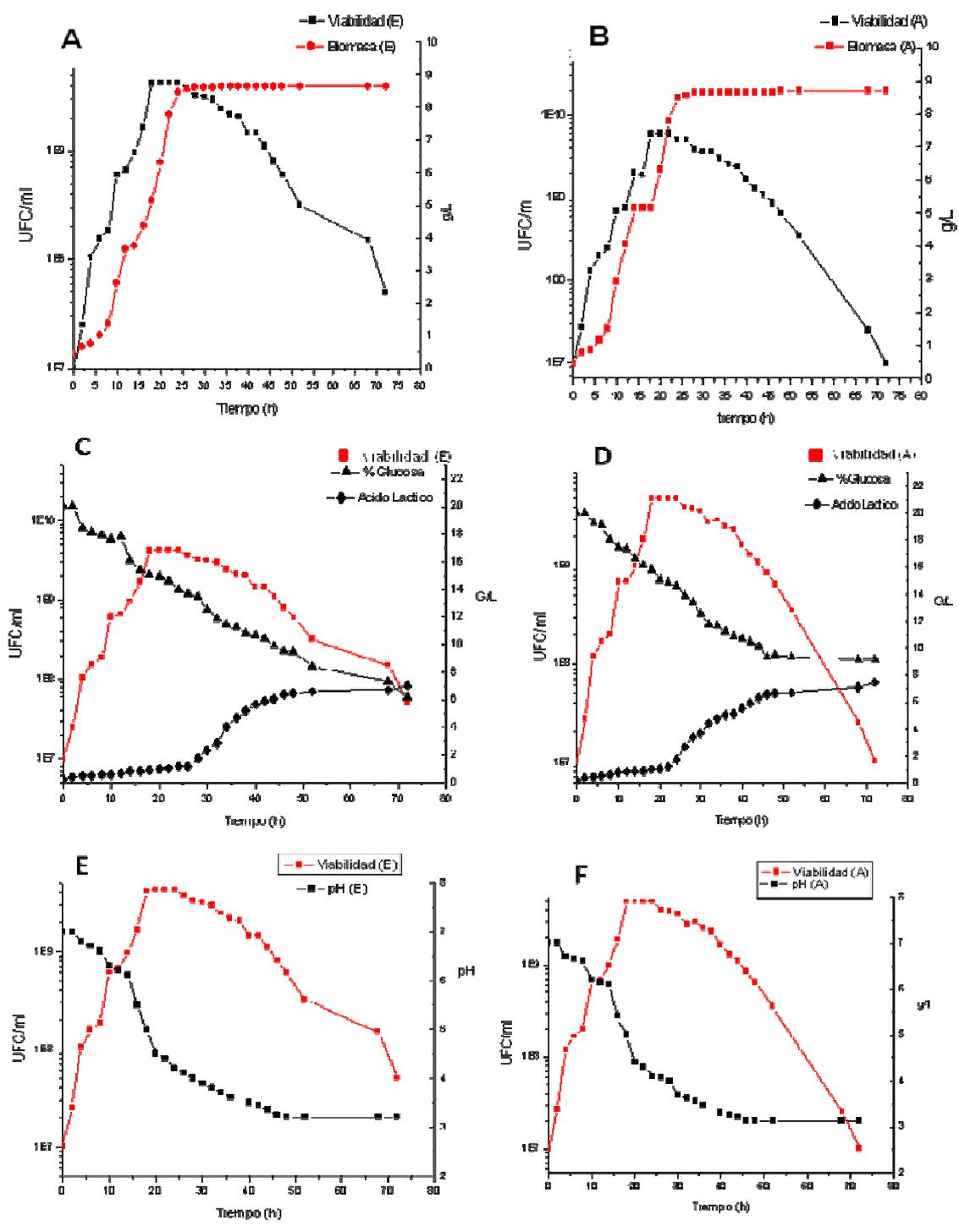


Figura 18. Cinética de crecimiento del cultivo de *Lactobacillus* en medio MSB comparando las condiciones de aireación. **A.** Comparación del recuento de Lactobacilos, con la biomasa alcanzada, en condición estática. **B** Comparación del recuento celular del cultivo, con la biomasa, en condición de agitación. **C.** relación entre el recuento de Lactobacilos, glucosa y á. láctico. en condición estacionaria. **D** comparación del recuento de Lactobacilos, glucosa y á. láctico, bajo condición de agitación. **E,** comparación entre el recuento de Lactobacilos y el pH alcanzado durante condición estacionaria. **F.** comparación entre el recuento de Lactobacilos y el pH alcanzado, durante condición de agitación.

Como puede observarse, En la Fig. 18 A y 18 B, hubo un mayor recuento de células viables y de biomasa de *Lactobacilos* cuando el cultivo se sometió a condiciones de agitación en contraste a los datos obtenidos en el cultivo estático, esto se explica debido a la presencia y distribución uniforme de oxígeno y nutrientes durante la agitación del cultivo, que permite se incremente la velocidad de crecimiento y los índices de biomasa. Existen reportes de Estela y cols., 2007 en los que concluyen que la incorporación de cantidades mínimas de oxígeno (condición de agitación) en el sistema tuvo un efecto favorable sobre el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* .En la fig18A, se observa que la fase de adaptación (lag) fue muy corta, dando inicio la fase exponencial (log), a las 2 h, de incubación, periodo relativamente corto, debido a que el inóculo provenía de un cultivo fresco de 24 h. también se observa que la fase logarítmica tanto en condiciones estáticas como de agitación, se mantuvo hasta las 20 h, alcanzando en este tiempo de incubación un recuento máximo de 4.25×10^9 UFC/ml y 4.95×10^9 UFC/ml, en el cultivo estacionario y de agitación, respectivamente. El recuento de células vivas durante la cinética no fue estadísticamente significativo, indicando que condiciones de aerobiosis/agitación, no influyen en el crecimiento de la cepa en el mismo medio, y la opción de un cultivo estacionario a escala es viable y de esta manera se evitarían los costos que conlleva un cultivo bajo condiciones de aerobiosis. En la fig. 18B, se muestran los valores de biomasa alcanzados durante el crecimiento de *Lactobacillus* en medio MSB a partir de las 24 h de crecimiento, de 8.65 g/L en condiciones estacionarias y de 8.7 g/L, en condiciones de agitación, no encontrando diferencias significativas entre estas condiciones, estos resultados concuerdan con los datos reportados por Guerra y cols, donde obtienen valores de 8.63 g/L de biomasa alcanzados por *Lactococos lactis*, con un rápido crecimiento agotando la fuente de carbono presente en el medio (Guerra y cols, 2006). Después de las 28 h de crecimiento los valores de biomasa de *Lactobacillus* permanecieron constantes a través del tiempo en ambas condiciones de cultivo, debido a que no hay lisis celular (Fig. 18B), en cambio el recuento de UFC/ml (Fig. 18A) alcanzó la fase estacionaria en la curva de crecimiento a las 20 h hasta las 24 h , al término de esta fase, se observa una

rápida disminución en el recuento celular en función del tiempo, lo que nos indica el inicio de la fase de muerte celular, iniciando a las 26 h con un recuento de 3.70×10^8 UFC/ml (CE) y 3.95×10^8 UFC/ml (CA), obteniendo recuentos cada vez menores hasta las 72 h, la fase de muerte se debe al agotamiento de nutrientes y reservas de energía y nos indica los tiempos específicos para detener la cinética de crecimiento, después de hacer la determinación de metabolitos (ác. Láctico, bacteriocinas), de interés. En ambas figuras, (18 A y 18 B), se observa una relación entre estos dos parámetros, que va desde la fase de lag hasta la fase estacionaria. Es en esta fase estacionaria donde los microorganismos suelen adaptarse a la falta de nutrientes (condición de latencia): supervivencia prolongada, incremento en la resistencia a condiciones de stress (salino, térmico, oxidativo, osmótico), etc. Hay expresión diferencial de genes al entrar al estado estacionario. Algunas células pierden la capacidad de reproducirse, pero se mantienen viables (viables no cultivables), sin embargo, la producción exponencial de los metabolitos, y la velocidad de crecimiento es proporcional al número de microorganismos y nutrientes presentes en el medio (Voget, 2005). Como puede observarse a partir de las 28 h los valores de biomasa alcanzada permanecen constantes con respecto al tiempo, se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ), para cada uno de los tiempos, y la velocidad máxima de crecimiento (μ máx.), de la cepa 22 crecida en medio MSB a las 8 h de incubación con un valor de 0.2962 y 0.300 bajo condiciones estacionarias y de agitación, respectivamente, estos valores son prácticamente iguales comparables por los reportados por otros autores (Rodríguez y cols., 2006) en donde la μ máx encontrada fue de 0.234 h^{-1} . diferente en un 33% , En la fig18C, se muestra la comparación entre el número de células de la cepa 22, la glucosa consumida y el ácido láctico producido en función del tiempo, bajo condición estacionaria , En la fig 18D se muestra la comparación entre el ácido láctico producido y la glucosa consumida, en función del tiempo bajo condición de agitación, como puede observarse a medida que el microorganismo entra en la fase de crecimiento exponencial la glucosa empieza a consumirse, este mismo patrón se observa en ambas condiciones de aireación (fig18C y fig. 18D), en donde hay una relación entre el número de células producidas y el consumo de glucosa, En el tiempo 24 cuando se

alcanza el máximo número de células viables, la glucosa tiene una disminución del valor inicial de 20g/L, tiempo 0 h, encontrando 13.95 g/L y 14.1 g/L bajo condiciones estacionarias y de agitación respectivamente, como puede observarse la velocidad de consumo de glucosa es mayor bajo condiciones de agitación, con lo que concuerda con lo ya descrito anteriormente que durante la agitación se obtiene una distribución uniforme de oxígeno y nutrientes, que permite se incremente la velocidad de crecimiento y por lo tanto el consumo de glucosa es mayor. El consumo de glucosa no permite determinar la afinidad del microorganismo por el sustrato y su efectividad en la producción de metabolitos de interés como las bacteriocinas. En la figura **18C** y **18D** observamos que a medida que se consume la glucosa la producción de ácido láctico en el medio aumenta, como se muestra una clara correlación entre la glucosa consumida y el ácido láctico producido bajo condiciones estáticas y de agitación en las que no se encontró diferencia significativa entre estos valores. Como se observa la glucosa alcanza su mínima concentración a las 72 h con 7.02 g/L (fig. **18C**) y 7.47g/L (Fig. **18D**), bajo condición estacionaria y de agitación respectivamente, y el ácido láctico producido fue de 9.18 g/L para condición estacionaria y 9.15 g/L, en condición de agitación, tampoco se encontró diferencia significativa entre ambas condiciones. Este comportamiento puede describirse como un proceso con generación de metabolitos primarios que están parcialmente asociados al crecimiento celular y se dan luego de que las células han alcanzado su madurez. La presencia de altas cantidades de azúcares en el medio de fermentación y al final de la fermentación 16 g/L indican que otro factor (algunos compuestos como los aminoácidos, péptidos, vitaminas o cationes, suplementados con el extracto de levadura empezaron a limitar el crecimiento que fue severamente inhibido por el pH final cerca de 4.6 alcanzado al final de la fermentación, se hace más pronunciado debido al consumo doble entre el microorganismo y la generación de metabolitos. La cinética de generación del ácido láctico, como producto de fermentación de la cepa de *Lactobacillus para paracasei* presentó un comportamiento similar bajo las diferentes condiciones de aireación, encontrándose a las 24h un valor de 1.34 g/L bajo condición estacionaria (Figura 18 **C**) y de 1.74 g/L, bajo condición de agitación (Figura **18D**) no se encontró diferencia significativa

entre estos valores. Como se observa en las figuras **18C y 18B**, hay una relación ente la generación de ácido láctico y el crecimiento es decir a medida que aumenta el crecimiento hay más generación de producto esto se observa claramente en la fase exponencial este comportamiento indica una producción de metabolitos generados por el microorganismo, podría ser en una proporción de ácido láctico y otros compuestos que acidificaron el medio, como se describe en la literatura, El tiempo en el que se logra una concentración máxima de ácido láctico en el medio coincide con el máximo valor de recuento celular obtenido, lo que indica que es un producto asociado parcialmente al crecimiento celular. Por ello en la etapa primera del proceso, que coincide con la fase de adaptación del microorganismo, existe una concentración de ácido láctico inicial; esto es similar con lo reportado por (Tsuchiya, 2003). En la figura **18E y 18F** se muestra la correlación, entre el recuento de *Lactobacillus* y el pH alcanzado bajo diferentes condiciones de aireación, un valor de pH, que tratándose de una bacteria láctica cuya ruta metabólica es heterofermentativa, es muy importante saber, el valor de pH de 4,7 alcanzado al final de la fermentación; este valor no es muy adecuado para la producción, se inhibe a valores de pH bajos entre 5 y 4,5 De acuerdo a otros investigadores el pH óptimo para el transporte de nutrientes usualmente varía entre 6.0 y 6.5 disminuyendo rápidamente por esta razón la falta de crecimiento a pH ácido es probablemente ser la causa por una limitación de los procesos citoplasmáticas como acidificación del citoplasma o el colapso de la fuerza motriz.

10. CONCLUSIONES

- El crioprotector glicerol resulto ser el mejor para la conservación de las cuatro cepas de *Lactobacillus*.
- El medio MSB favoreció un recuento viable y producción de biomasa, mejor comparado con los demás medios evaluados.
- El medio MSB, resulto ser significativamente más económico, con un costo de \$54.56, MN en comparación con \$103.68 MN, del medio MRS (Oxoid).
- Las cepas de estudio crecidas en el medio MSB y los sobrenadantes presentaron actividad antagonista contra EHEC y *Salmonella entérica* serovar *Typhi* lo que resulta de gran interés para la industria de los alimentos y conservación de estos.
- La actividad antagónica de los sobrenadantes es indicativo de la presencia de sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas.
- Las cepas de *Lactobacillus para paracasei* presentaron un patrón de adherencia agregativa sobre las células HeLa, confirmando una de sus características probióticas.
- Se observó un mayor número de microorganismos adheridos previamente crecidas en el medio MSB, seguido del medio MRS* y al final del medio MRS.
- Se mostraron algunas diferencias en cuanto a tamaño y grosor de los Lactobacilos adheridos a las células, debido quizá a la composición del medio de cultivo.
- La cepa 22 fue elegida para realizar la cinética, por los resultados obtenidos en los parámetros evaluados, biomasa, antagonismo, adherencia, etc.
- Los recuentos bacterianos en condición estacionaria y de agitación, no presentaron diferencias significativas, es decir, no hay un efecto significativo de ésta condición de aireación, sobre el recuento de la cepa 22.
- La biomasa producida durante la cinética de crecimiento no fue estadísticamente significativa, presentando un valor máximo a las 24h

de crecimiento de 8.65 g/L en condición estacionaria, y un valor 8.7 g/L en condición de agitación.

- El consumo de glucosa durante la fermentación en ambas condiciones no fue estadísticamente significativo presentando un valor máximo de consumo a las 24 h. de 13.95 g/L y 14.1 g/L bajo condición estacionaria y de agitación, respectivamente.
- El ácido láctico producido en condiciones de agitación fue de 1.74 g/L y en cultivo estático 1.34 g/L. Los valores fueron muy similares y no tuvieron significancia estadística.
- Las bacterias se adaptan durante su crecimiento a la presencia de ácido Láctico producido en el Medio MSB.
- La producción biotecnológica de este microorganismo, puede llevarse a cabo en cultivos estáticos, reduciendo costos para su elaboración.

11. PERSPECTIVAS PARA TRABAJOS FUTUROS

- ❖ Desarrollo a escala piloto e industrial del cultivo con potencial probiótico.
- ❖ Realizar la microencapsulación de la cepa probiótica y evaluar la sobrevivencia de la cepa *Lactobacillus para paracasei* adicionada en un alimento
- ❖ Aislamiento y purificación de las bacteriocinas producidas.
- ❖ Acondicionar el medio con otros componentes para optimizar la producción de biomasa y bacteriocinas
- ❖ Realizar estudios clínicos en seres humanos, utilizando la cepa de *Lactobacillus* aislada de aguamiel, para evaluar su potencial probiótico

12. REFERENCIAS

- ❖ Aiba, Y., Suzuki, N., Kabir, A., Takagi, A., Koga, Y. **1998**. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the Oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a Probiotic in a Gnotobiotic Murine model. *Am J Gastroenterol* 93, 2097-2101.
- ❖ Alakomi, H.L., Skyttä, E., Sandholm, T., Kala, K., Helander, I.M. **2000**. Lactic acid permeabilises Gram-negative bacteria by Disrupting their Outer Membrane. *Appl. Environ. Microbiol* 66, 2001-2005.
- ❖ Alander, M., Karpela, R., Saxelin, M., Vilpponen, T., Mettälä, A. **1997**. Recovery of *Lactobacillus rhamnosus* GG from human colonic biopsies. *Letters of Applied Microbiology*. 24, 361-364.
- ❖ Allende, A., Martínez, B., Gil M.S.V., Suárez, J., Rodríguez, A. **2007** Growth and bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes in vitro* and in fresh-cut lettuce. *Food Microbiology* 24, 759-766.
- ❖ Ampe, F., Nabil, B., Moizan, C., Wachter, C., Guyot, J.P. **1999**. Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Appl. Environ. Microbiol* 65 (12),5464-5473.
- Anal, A.K., Singh, H. **2007**. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology* 18, 240-251.
- ❖ Arunachalam, K., Gill, H.S., Chandra, R.K. **2000**. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur. J. Clin. Nutr* 54(3), 263-267.
- ❖ Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A., Lebrihi, A. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology* 68, 93–104.

- ❖ Axelsson L. **2006**. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Third Edition.. *Food Science and Technology*. Editorial Board. 1, 1-66.
- ❖ Barbu, V., Balotescu, C. **2007**. Colonization of intestinal mucosa and barrier effect of *Lactobacillus brevis* 16GAL. *The Annals of the University Food Technology*. 50-55.
- ❖ Barefoot, S., Nettles, G. **1993**. Antibiosis Revisited: Bacteriocins Produce by Dairy Starter Cultures. *J Dairy Sci* 76, 2366-2379.
- ❖ Bauer, R., Chikindas, M.L., Dicks, L.M.T. **2005**. Purification, partial amino acid sequence and mode of Pediocin PD-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus* NCFB 1832. *International Journal of Food Microbiology* 101, 17-27.
- ❖ Bernbom, N., Licht, T., Saadbye, P., Vogensen, F. **2006**. *Lactobacillus plantarum* inhibits growth of *Listeria monocytogenes* *in vitro* continuous flow gut model, but promotes invasion of *L. monocytogenes* in the gut of gnotobiotic rats. *International Journal of Food Microbiology* 108, 10-14.
- ❖ Bezkorovainy A. **2001**. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut. *Am J. Nutr* 73 (suppl), 399S-405S.
- ❖ Braat, H., Tol, E.V., Hommes, D., Peppelenbosch, M., Deventer, S. **2004**. *Lactobacillus rhamnosus* induces Peripheral Hyporesponsiveness in stimulated CD4₊ T cells via modulation of Dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 80, 1618-1625.
- ❖ Brashears, M.M., Jaroni, D., Trimble, J. **2003**. Isolation, Selection, and Characterization of Lactic Acid Bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. *J. Food Prot* 66, 355–363.
- ❖ Brink, M., Fraser, T., Todorov, S.D., Vaz-Velho, M., Senekal, M., Dicks, L.M.T. **2003**. A combined use of probiotics and prebiotics in a soymilk-based food supplement aimed at improving the gastro-intestinal flora of children with HIV aids. *Agric. Food Chem* 2(4), 504-509.

- ❖ Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.P., Delboni, R.R., Oliveira J. **2004**. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 137-144.
- ❖ Bruno, M.E.C., Montville, T. **1993**. Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* 59(9), 3003-3010.
- ❖ Calderón, O., Fadila, C., Chavez, C., Villalobos, L., Arias, M.L. **2007**. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición* 57 (1), 24-32.
- ❖ Canducci, F., Armuzzi, A., Cremonini, F., Cammarota, G., Bartolozzi, F., Pola, P., Gasbarrini, G., Gasbarrini, A. **2000**. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther* 14, 1625-9.
- ❖ Castellano, P., Raya, R., Vignolo, G. **2003**. Mode of action of Lactocin 705, a two-component bacteriocin from *Lactobacillus casei* CRL705. *International Journal of Food Microbiology* 85, 35-43.
- ❖ Castro, G.B., Bustos, V.G., Ramírez, J.A. **2008**. Aprovechamiento biotecnológico de la Melaza de caña de azúcar para la producción de ácido láctico utilizando *Lactobacillus rhamnosus*. *Revista Universitaria* 3(2), 1-8.
- ❖ Cervantes, C.M., Pedroza-Rodríguez, A.M. **2007**. El pulque: características microbiológicas y contenido alcohólico mediante espectroscopia Raman. *Publicación científica en ciencias biomédicas* 5 (8), 1794-2470.
- ❖ Chang, Y.H., Kim, J.K., Park, Y.H. **2001**. Selection of a potential probiotic *Lactobacillus* strain and subsequent *in vivo* studies. *Antonie van Leewenhoek* 80, 193-199.

- ❖ Chukeatirote, E. **2003**. Potential Use of Probiotics. *J. Sci. Technol* 25(2), 275-282.
- ❖ Coconnier, M.H., Lievin, V., Bernet-Camard, M.F., Hudault, S., Servin, A.L. **1997**. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 1046-52.
- ❖ Coconnier, M.H., Liévin, V., Hemery, E., Servin, A.L. **1998**. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain. *Appl Environ Microbiol* 64, 4573-4580.
- ❖ Cotter, P.D., Hill, C. **2003**. Surviving the Acid test: responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews* 67 (3), 429–453.
- ❖ Coudeyras, S., Marchandin, H., Fajon, C., Forestier, C. **2008**. Taxonomic and Strain-Specific Identification of the Probiotic Strain *Lactobacillus rhamnosus*-35 within the *Lactobacillus casei* Group. *Applied and Environmental Microbiology* 74 (9), 2679–2689.
- ❖ Crittenden, R., Weerakkody, R., Sanguansi, L., Augustin, M. **2006**. Synbitic Microcapsules that enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage y Gastrointestinal Transit. *Applied and Environmental Microbiology* 72(3), 2280-2282.
- ❖ Crociani, J., Grill, J.P., Huppert, M., Ballongue, J. **1995**. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with *in vivo* study. *Lett. Appl. Microbiol* 21, 146-148.
- ❖ Deegan, L.H., Cotter, PD., Hill, C., Ross, P. **2006**. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal* 16, 1058-1071.
- ❖ Delgado, A., Arroyo, N., Brito, D., Pérez, C., Fevereiro, P., Fernández, A. **2007**. Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology* 130,193-201.
- ❖ Deraz, S., Plieva, F.M., Galaev, Y.I., Karlsson, E.N., Mattiasson, B. **2007**. Capture of bacteriocins directly from non-clarified fermentation

broth using macroporous monolithic cryogels with phenyl ligands. *Enzyme and Microbial Technology* 40, 786-793.

- ❖ De Roos, N.M., Katan, M.B. **2000**. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: A review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr* 71, 405-411.
- ❖ Devlieghere, F., Debevere, J. **2000**. Influence of carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria. *Lebensm. Wiss. Technol* 33, 531-537.
- ❖ De Vuyst, L. y Vandame, E.J. **1994**. "Antimicrobial potential of lactic acid bacteria". En *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and application*. De Vuyst, L. y Vandame, E.J. (eds.). pp. 91-142. Chapman & Hall, Ltd. London
- ❖ Dimitrijević, S., Baras, J. **2001**. Comparative study on biochemical activity of the intestinal isolates *Lactobacillus* sp. V3 an *Bifidobacterium* sp. A71 in different substrates *J.Serb.Chem.Soc* 66(9), 581–589.
- ❖ Diep, B.D., Skaugen, M., Salehian, Z., Holo, H., Nes, I.F. **2007**. Common mechanisms of target cell recognition and immunity for class II bacteriocins. *PNAS February* 13, (104), 7. 2384–2389.
- ❖ Dolz, M.C. **2008**. Bacteriocinas de probióticos. Nuevos enfoques bioterapéuticos: PINHE. *Nutr. Clin det hosp.* 28 (3), 20-37.
- ❖ Dunne, C., O'Mahony, L., Murph, L.L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.S., Shanahan, F., Collins, J.K. **2001**. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am J Clin Nutr* 73(suppl), 386S–92S.
- ❖ El-Nezami, H., Mykkänen, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. **2000**. Ability of *Lactobacillus* and *Probionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from chicken duodenum. *J Food Protect* 63, 549-552.
- ❖ Estela, W., Rychtera, M., Melzoch, K., Quillama, E., Egoavil, E. **2007**. Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* L10 en cultivos batch y continuo. *Rev. peru. biol.* 14(2): 271-275

- ❖ FAO/WHO **2001**. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk and Live Lactic Acid Bacteria. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report. (<http://www.who.int/foodsafety/publications/>).
- ❖ Farid, A., Kabeir., Zamberi, S., Shuhaimi, M., Ghazali, H. M., Yazid, A. **2008**. Adhesion Properties of *Bifidobacterium Pseudocatenulatum* G4 y *Bifidobacterium longum* BB536 on HT-29 Human Epithelium Cell Line at Different Times and pH. *International Journal of Biological and Medical Sciences* 3(4), 267-271.
- ❖ Felley, C.P., Corthesy, T.I., Rivero, J.L., Sipponene, P., Kaufmann, B.P., Wiesel, PH., Brassart, D., Pfeifer, A., Blum, AL., Michetti, P. **2001** Favourable effect of acidified milk (LC-1) on *Helicobacter gastritis* in man. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 13(1), 925-937.
- ❖ Figueroa, J.V., Chi, E.E.M., Cervantes, C.R., Domínguez, I.A. **2006**. Alimentos funcionales para cerdos al Deteste. Functional food for weanling pigs. *Vet Méx* 37 (1) 117-126.
- ❖ Fiorentini, A., Sant, Anna, E., Porto, A., Mazo, J.Z., Francos, B. **2001**. Influence of Bacteriocins Produced By *Lactobacillus Plantarum* BN in the Shelf-Life of Refrigerated Bovine Meat. *Brazilian Journal Of Microbiology* (2001) 32:42-46
- ❖ Fontaine, E.A., Claydon, E., Tayler-Robinson, D. **1996**. *Lactobacilli* from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide. *Microb. Ecol. Health Dis* 9, 135-141.
- ❖ Fooks, L.J., Gibson, G.R. **2002**. Probiotics as modulators of the gut flora. *British Journal of Nutrition* 88 (1), S39-S49.
- ❖ Franz, C.M.A.P., Du, T.M., Olasupo, N.A., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. **1998**. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE905 ready-to-eat salad. *Lett. Appl. Microbiol* 26,231-235.
- ❖ Fresney, R., 1990. Cell lines all cultures. 3a edición, EUA, P. 1.10-1.

- ❖ Galdeano, C.M., Perdigón, G. **2004**. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J. Appl. Microbiol* 97, 673-681.
- ❖ García, M.S., Martínez, F.C., Anastasio, E., Santiago, E.M., Pérez, R. **2007**. Los Probióticos como Alternativa Médica. Libro: *Temas Selectos de Microbiología. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla*. 119-136
- ❖ Ghrairi, T., Frère, J., Berjeaud, J.M., Manai, M. **2005**. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. *International Journal of Food Microbiology* 105: 389-398.
- ❖ Gilliland, S.E., Walker, D.K., **1990**. Factors to consider when selecting a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in humans. *J. Dairy Sci* 73, 905-911.
- ❖ Giono, S.C., Castro, G. **2007**. Manual sobre conservación de microorganismos. Escuela Nacional de ciencias biológicas. *Instituto Politécnico Nacional* 3-29.
- ❖ Gratz, S., Wu, Q.K., El-Nezami, H., Juvonen, O., Mikkanen, H., Turner, P.C. **2007**. *Lactobacillus rhamnosus* Strain GG Reduces Aflatoxin B1 Transport, Metabolism, and Toxicity in Caco-2 Cells *Applied And Environmental Microbiology* 73(12), 3958–3964.
- ❖ Gravesen, A., Birgitte, K., Holmstrøm, K., Hoiby, P.E., Ramnath, M., Knøchel, S. **2004**. Mediated Nisin Resistance Mechanism in *Listeria monocytogenes* Confers Cross-Protection to Class IIa Bacteriocins and Affects Virulence Gene Expression. *Appl. Environ. Microbiol* 70(3), 1669-1679.
- ❖ Goktepe, I. **2006**. Probiotics as Biopreservatives for Enhancing Food Safety. *Probiotics in Food Safety and Human Health* Edited: M. Taylor & Francis (13), 285-307.
- ❖ Goldin, B., Gorbach, S.L., Savelin, M., Barakat, S., Gualtier, L., Salminen, S. **1992**. Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in

human gastrointestinal tract. *Digestive diseases and Sciences*, 37, 121-128.

- ❖ González, R. **2002**. Evaluación de la estabilidad del método de criopreservación en glicerol para el establecimiento de un banco de cepas. Tesis pegrado Microbiología. *Pontificia Universidad Javeriana Facultad de ciencias. Departamento de Microbiologia, Bogotá*. 118 p.
- ❖ Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S. **2001**. *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus DR20* and *Bifidobacterium lactis DR10* strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int Food Microbiol* 67(3), 207-216.
- ❖ Gouesbet, G., Jan, G., Boyaval, P. **2002**. Two-Dimensional Electrophoresis Study of *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus Thermotolerance*. *App. Environ.Microbiol* 68(3), 1055-1063.
- ❖ Grajek. W., Olejnik, A., Sip, A. **2005**. Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods. www.actabp 52(3), 665–671.
- ❖ Guandalini, S., Pensabene, L., Zikri, M.A., Diaz, J.A., Casali, L.G., Hoekstra, H., Kolacek, S., Massar, K. Micetic-Turk, D. Papadopoulou, A., Sousa, J.S., Sandhu, B., Szajewska, H., Weizman, Z. **2000**. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: A multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30, 54-60.
- ❖ Guerra, N.P., Rua, M.L., Pastrana, L. **2001**. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. International. *Journal of Food Microbiology* 70, 267-281.
- ❖ Guerra, N.P., Bernárdez, P.F., Castro, L.P. **2007a**. Fed-Batch pediocin production on whey using different feeding media. *Enzime and Microbial Technology* 41, 397-406.
- ❖ Guerra, N.P., Agrasar, A.T., López C., Bernardez, P.F., Castro, L.P. **2007b**. Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CECT 539 in both batch

and re-alkalized fed-batch cultures. *Journal of Food Engineering* 82, 103-113

- ❖ Hans, G.H., Heilig, E., Zoetendal, G., Vaughan, E., Akkermans, A., Willem, E. **2002**. Molecular Diversity of *Lactobacillus* spp. and Other Lactic Acid Bacteria in the Human Intestine as Determined by Specific Amplification of 16S Ribosomal DNA. *Applied and environmental microbiology* 68(1), 114–123.
- ❖ Hassan, S., Zahrant, A., Saleh, F. **2006**. Production of Bacteriocin by four lactic Acid Bacteria Isolated from Raw Milk on Organic Waste. *World Applied Sciences Journal*, 1 (2), 135-143.
- ❖ Heller, K. **2006**. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am J. Clin Nutr* 73 (Suppl), 374S-379S.
- ❖ Henriksson, A., Khaled, A.K.D., Conway, P.L. **1999**. *Lactobacillus* colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecreting stomach region. *Microb Ecol Health Dis* (11), 96–9.
- ❖ Hilton, E., Isenberg, H.D., Alperstein, P., France, K., Borenstein, M.T. **1992**. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for *Candida vaginitis*. *Ann Intern Med* 116, 353-357.
- ❖ Hilton, E., Rindos, P., Isenberg, H.D. **1995**. *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol* 33, 1427-1433.
- ❖ Hilton, E., Kolakowski, P., Singer, C., Smith, M. **1997**. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travellers. *J Travel Med* 4, 41-43.
- ❖ Hinke, N. **2007**. Breve léxico del Maguey. *Ciencias Julio-Septiembre*. 87, 24-27.
- ❖ Hoek, P.V., Hulster, E., Dijken, J.P., Pronk, J.T. **1999**. Fermentative Capacity in High cell-density fed Batch cultures of Baker's Yeast. *Biotechnology and bioengineering* 68(5), 517-523.

- ❖ Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. **2000**. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable sources. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 87-107.
- ❖ Holzapfel, W. H. **2006**. Introduction to prebiotics and probiotics. Probiotics in Food Safety and Human Health Edited: Goktepe Ipek, Juneja K; Ahmedna M. *Taylor & Francis* 1, 1-33.
- ❖ Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Veld, J.H.J. **1998**. Overview of gut flora and probiotics. *Intl J Food Microbiol* 41, 85-101.
- ❖ Hosada, M., Hashimoto, H., Morita, H. **1996**. Effect of administration of milk fermented with *Lactobacillus acidophilus* LA-2 on faecal mutagenicity and microflora in human intestine. *J Dairy Sci* 79, 745-749.
- ❖ Huebner, E.S., Surawicz, C.M. **2006**. Treatment of Recurrent *Clostridium difficile* Diarrhea. *Gastroenterology & Hepatology* 2(3), 203-208.
- ❖ Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, T., Monfort, J.M. **1993**. Biochemical characterization of *lactobacilli* from dry fermented sausages. *Int. j. food Microbiol* 18, 107-113.
- ❖ Hui, Y.H., Rosmini, M.R., Guerrero, M.I. **2006**. Ciencia y Tecnología de Carnes. *México Df Limusa* 1-634.
- ❖ Humen, M., De Antoni, G., Benyacoub, J., Costas, E., Cardozo, M.I., Kozubsky, L., Saudan, K., Bruand, A., Blum, S., Schiffrin, J., Perez, F. **2005**. *Lactobacillus johnsonii* La1 Antagonizes *Giardia intestinalis* In Vivo. *Rev Infection and Immunity* 73(2), 1265-1269.
- ❖ Ibrahim, S.A., O'Sullivan, D.J. **2000**. Use of chemical mutagenesis for the isolation of food grade β -galactosidase overproducing mutants of bifidobacteria, *Lactobacilli* and *Streptococcus salivarius* ssp. *Thermophilus*. *J. Dairy Sci* 83, 923-930.
- ❖ Ingrassia, I., Leplingard, A., Darfeuille, A., **2005**. *Lactobacillus casei* DN 114 001 Inhibits the Ability of Adherent-Invasive *Escherichia coli* Isolated from Crohn's Disease Patients to Adhere to and to Invade

Intestinal Epithelial Cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 71 (6), 2880- 2887.

- ❖ Isolauri, E. **2001**. Probiotics in prevention and treatment of Allergic Disease. *Pediatr Allergy Immunol* 12(S14), 56-59.
- ❖ Isolauri, E., Kirjavainen, P.V., Salminen, S. **2002**. Probiotics: A role in the treatment of intestinal infections and inflammation. *Gut* 50, 54-59.
- ❖ Ivanova, E., Chipeva, V., Ivanova, I. **2002**. Encapsulation of Lactic Acid Bacteria in calcium Alginate Beads for Bacteriocin Production. *Journal of culture collections* 3, 53-58.
- ❖ Jiménez, A. **2007**. Composición y Procesamiento de la Soya para Consumo Humano. *Investigacion y Ciencia* 37, 35-44.
- ❖ Juarez, M.S., Bru de Labanda, E., Pesce de Ruiz, A., Nader-Macías, M.E. **2002**. Estimation of vaginal probiotic *Lactobacilli* growth parameters with the application of the Gompertz model. *Can. J. Microbiol.* 48,82-92.
- ❖ Kabir, A.M., Aiba, Y., Takagi, A., Kamiya, S., Miwa, T., Koga, Y. **1997** Prevention of *Helicobacter pylori* infection by *lactobacilli* in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41, 49-55.
- ❖ Kale, V.V., Sanjay, T., Bhusari, K., **2005**. Development and Evaluation of a Suppository Formulation Containing *Lactobacillus* and Its Application in Vaginal Diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci* 1056: 359–365.
- ❖ Kalliomaki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P., Isolauri, E. **2001**. Probiotics in primary prevention of atopic disease: A randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, 1076-9.
- ❖ Katla, T., Moretro, T., Aasen, I.M., Holck, A., Axelsson, L., Naterstad, K. **2001**. Inhibition of *Listeria monocitogenes* in cold smoked salmon by addition of sakacin P and/or live *Lactobacillus sakei* cultures. *Food Microbiol* 18, 431-439.
- ❖ Katla, T., Moretro, T., Sveen, I., Aasen, I.M., Axelsson, L., Rorvik, L.M., Naterstad, K. **2002**. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold

- cuts by addition of sakacin P and sakacin P-producing *Lactobacillus sakei*. *J. Appl. Microbiol* 93,191-196.
- ❖ Kim, S.J., Cho, S.Y., Kim, S.H., Song, O.J., Shin, S., Cha, D.S., Park, H.J. **2008**. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *Swiss Society of Food Science and Technology* 41, 493–500.
 - ❖ Kosin, B., Rakshit, S.K. **2006**. Microbial and Processing Criteria for production of Probiotics: A Review. *Food Technol. Biotechnol* 44(3), 371-379.
 - ❖ Kröckel, L., Schillinger, U., Franz, M.A.P., Bantleon, A., Ludwig, W. **2003**. *Lactobacillus versmoldensis* sp. Nov., isolated from raw fermented sausage. *International Journal of Systematic and Evolutionary* 53, 513-517.
 - ❖ Kuleasan, H., Cakmakci, M.L. **2002**. Effect of reuterin produced by *Lactobacillus reuteri* on the surface of sausages to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Spp. *Nahrung* 46, 408-410.
 - ❖ Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukara, M., Tanaka, T., Shimazaki, K. **2004**. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87, 4050-4056.
 - ❖ Kwaadsteniet, T., Fraser, C.A., Van Reenen, L., Dicks, M.T. **2006**. Bacteriocin T8, a Novel Class IIa sec-Dependent Bacteriocin Produced by *Enterococcus faecium* T8, Isolated from Vaginal Secretions of Children Infected with Human Immunodeficiency Virus. *Appl. Environ. Microbiol* 72 (7), 4761-4766.
 - ❖ Lacroix, C., Yildirim, S. **2007**. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. *Current Opinion in Biotechnology* (18), 176-183.
 - ❖ Lanciotti, R., Patrignani, F., Bagnolini, F., Guerzoni, M.E., Gardini, F. **2003**. Evaluation of diacetyl antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*. *Food Microbiology* 20(5), 537-543.

- ❖ Leal-Sanchez, M.V., Jiménez, R., Maldonado-Barragán, A., Fernández, A., Ruiz-Barba, L. **2002**. Optimization of Bacteriocin Production by Batch Fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Applied And Environmental Microbiology*, 68 (9), 4465–4471.
- ❖ Lechiancole, T., Ricciardi, A. Parente, E. **2002**. Optimization of media and fermentation conditions for the growth of *Lactobacillus sakei*. *Ann. Microbiol* 52, 257-247.
- ❖ Leroy, F., De Vuyst, I. **1999**. The presence of Salt and a Curing Agent Reduces Bacteriocin Production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a Potential Starter Culture for Sausage Fermentation. *Applied and environmental microbiology* 65(12), 5350-5356.
- ❖ Leroy, F., De Vuyst, I. **2001**. Growth of the Bacteriocin-Producing *Lactobacillus sakei* Strain CTC 494 in MRS Broth Is Strongly Reduced Due to Nutrient Exhaustion: a Nutrient Depletion Model for the Growth of Lactic Acid Bacteria. *Applied and environmental microbiology* 67(10), 4407-4413.
- ❖ Leroy, F., Lievens, K., Vuyst, L.D. **2005**. Modeling Bacteriocin Resistance and Inactivation of *Listeria innocua* LMG 13568 by *Lactobacillus sakei* CTC 494 under Sausage Fermentation Conditions. *Applied And Environmental Microbiology*, 71 (11), 7567–7570.
- ❖ Lidbeck, A., Nord, C.E. **1991**. *Lactobacilli* in relation to human ecology and antimicrobial therapy (review). *Int. J. Tissue React* 13,115-122.
- ❖ Lima, E.T., Filho, L.A. **2005**. Bacteriocins: nomenclature, detection, mechanism of action and potential use in poultry production. *Journal of Food, Agriculture & Environmenal* 3(2), 62-66.
- ❖ Loessner, M., Guenther, S., Steffan, S., Scherer, S. **2003**. A pediocin-producing *Lactobacillus plantarum* strain inhibits *Listeria monocytogenes* in a multispecies cheese surface microbial ripening consortium. *Appl. Environ. Microbiol* 69, 1854-1857.
- ❖ López-Brea, M., Domingo D., **2007**. Revisión Antibioticoterapia con probióticos. *Rev Esp Quimioterap* 20 (2), 170-181.

- ❖ Maldonado, A., Jiménez, R. Ruíz-Barba J. **2004**, Induction of Plantaricin Production in *Lactobacillus plantarum* NC8 after Coculture with Specific Gram-Positive Bacteria Is Mediated by an Autoinduction Mechanism. *Journal of Bacteriology* 186 (5), 1556–1564.
- ❖ Maldonado, A.C., Gutierrez, L.A., Montoya, O.I. **2005**. Evaluación *in vitro* del efecto bactericida de cepas nativas de *Lactobacillus* sp. contra *Salmonella* sp. y *Escherichia coli*. *Escuela de Biociencias. Facultad de Ciencias*. 34, 45-56.
- ❖ Marin, J. **2003**. Evaluación de métodos de conservación para cepas de hongos filamentosos con actividad enzimática amilolítica. Tesis de pregrado. Microbiología industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. 46-50.
- ❖ Marteau, R.P., De Vrese, M., Cellier, J.C., Schrezenmeir, J. **2001**. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr*. 73 (suppl), 430S-6S.
- ❖ Martin, J. D., Werner, B.G., Hotchkiss, J.H. **2003**. Effects of Carbon Dioxide on Bacterial Growth Parameters in Milk as Measured by Conductivity *J. Dairy Sci*. 86:1932–1940.
- ❖ Martínez, F., Gómez, S., Rodríguez, P., Páez, J., Urbina, G., Ortiz, B. **2002**. *Klebsiella pneumoniae* y *K. oxytoca* aisladas de niños con diarrea: Adherencia y citotoxicidad en líneas celulares. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 25(2), 100-104.
- ❖ Martínez, R., Franceschini, S., Patta, C., Quintana, S., Nunes, C., Moreira, S., Anukam, C., Reid, R., Martinis, C. **2008**. Analysis of Vaginal Lactobacilli from Healthy and Infected Brazilian Women. *Appl. Environ. Microbiol* 74(14), 4539-4542.
- ❖ Mauriello, G., Ercolini, D., Stora, L.A., Casaburi, A., Villani, F. **2004**. Development of polyethylene films for food packaging activated with an antilisteral bacteriocin from *Lactobacillus curvatus* 32Y. *J. Appl. Microbiol*; 97, 314-322.

- ❖ McCracken, V.J., Lorenz, R.G. **2001**. The gastrointestinal ecosystem: A precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell Microbiol* 3(1), 1-11.
- ❖ McFarland, V., Elmer, W. **2006**. Properties of Evidence-Based Probiotics for Human Health. Probiotics in Food Safety and Human Health Edited. *M. Taylor & Francis* 5, 109-137.
- ❖ Meng-Tsung, T., Girardin, E., Regnault, B., Le Bourhis, L., Dillies, J. **2006**. Anti-Inflammatory Effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-Infected Human Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 1128-1137
- ❖ Milner, J.A. **2000**. Functional Foods: the US perspective. *Am J Clin Nutr* 71 (suppl), 1654S-9S.
- ❖ Mitsuoka, T. **1992**. Intestinal Flora and Aging. *Nutrition Reviews* 50 (12), 438-446.
- ❖ Mountzouris, K.C., Tsirtsikos, P., Nitsch, S., Schatzmayr, G., Fegeros, K. **2007**. Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities. *Poultry Science* 86, 309–317.
- ❖ Motta, A.S., Olivera, C.F., Brandelli, A. **2004**. Screening For Antimicrobial Activity Among Bacteria Isolated From The Amazon Basin. *Brazilian Journal of Microbiology* 35, 307-310.
- ❖ Mullan, M. **2005**. Dairy and Food Technology. *Lecturer in Food Technology in the Department of Food Science, at Queen's University Belfast*. 189-197.
- ❖ Neysens, P., Messens, W., Gevers, D., Swings, J., De Vuyst, L. **2003**. Biphasic kinetics of growth and bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE471 occur under stress conditions. *Food Microbiology* 149, 1073–1082.

- ❖ Nout, M.J.R., Kiers J.L. **2005**. Tempe fermentation, innovation y functionality: update into the third millennium. *Journal of Applied Microbiology* 98,789-805.
- ❖ Nowroozi, J., Mirzai, M., Norouzi, M. **2004**. Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria. *J Publ Health* 33 (2) 1-7.
- ❖ Oatley, J.T., Rarick, M.D., Ji, G.E., Linz, J.E. **2000**. Binding of aflatoxin B1 to *bifidobacteria in vitro*. *J Food Prot* 63, 1133-6.
- ❖ Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Takahashi, M., Watanuki, M., Tanaka, R., Tanaka, T., Hamabata, T., Yamasaki, S., Takeda, Y. **2001**. Protective effect of *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 infection in infant rabbits. *Infect Immun* 69, 1101-8.
- ❖ Ogawa, T., Asai Y., Tamai, Y., Sakamoto, H., Hashikawa, S., Yasuda, K. **2005**. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei ssp. casei* in conjunction with dextran. *Clinical and Experimental Immunology*, 143,103-109.
- ❖ Ogunbanwo S.T., Nyberg, G., Wrethen A.I., Sanni, A., Onilude, A. **2003**. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1 200. *Afr. J. Biotechnol* 2 (7), 179-184.
- ❖ Oh, S., Rheem, S., Sim, J. Kim, S., Baek, Y. **1995**. Optimizing Conditions for the Growth of *Lactobacillus casei* YIT 9018 in Triptone-Yeast Extract-Glucose Medium by Using Response Surface Methodology. *Applied and Environmental Microbiology* 61(11), 3809-3814.
- ❖ Oh, H., Wee, Y.J., Yun, J.S., Han, H., Jung, S., Ryu, H.W. **2005**. Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource technology* 96, 1492-1498.
- ❖ Onda, T., Yanagida, F., Uchimura, T., Tsuji, M., Ogino, S., Shinohara, T. **2002**. Widespread distribution of the bacteriocin-producing lactic acid cocci in Miso-paste products. *Journal of Applied Microbiology* 92, 695-705.

- ❖ Oozeer, R., Leplingard, A., Mater, D.G., Mogenet, A., Michelin, R., Seksek, I., Marteau, P., Dore, J., Bresson, J.L., Corthier, G. **2006**. Survival of *Lactobacillus casei* in the Human Digestive Tract after Consumption of Fermented Milk. *Applied And Environmental Microbiology*, 72 (8), 5615–5617.
- ❖ Oppegård, C., Per Rogne, L.E., Per Eugen, K., Fimland G., Nissen-Meyer, J. **2007**. The Two-Peptide Class II Bacteriocins: Structure, Production, and Mode of Action. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 210-219.
- ❖ Oscáriz, J.C., Pisabarro, A.G. **2001**. Classification and mode of action of membrane-active bactericins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol* 4, 13-19
- ❖ Ouwehand, C., Vesterlund, S. **2004**. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. Third Edition. Salminen S; Wright A. Ouwehand A. New York. *Food Science and Technology* 11, 375-395.
- ❖ Oyetayo, V.O. **2005**. Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system. *African Journal of Biotechnology* 4 (2), 123-127.
- ❖ Oxman, T., Shapira, M., Klein, R., Avazov, N., Rabinowitz, B. **2001**. Oral administration of *Lactobacillus* induces cardioprotection. *J Altern Complement Med* 7(4), 345-354.
- ❖ Páez, J., Risso, C., Martínez, F., Cavazza, M. **2000**. Identificación de un mecanismo de adherencia a las células Hep-2 en cepas de *Klebsiella pneumoniae* aisladas de casos de diarrea infantil. *Soc Venez Cien Morfol* 6(1-2), 30-6.
- ❖ Perdone, C.A., Bernabeu, A.O., Postaire, E.R., Bouley, C.F., Reinert, P. **1999**. The effect of supplementation by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhea in children attending day care centers. *Int J Clin Pract* 53,179-184.

- ❖ Pereira, D., Glenn, R, Gibson, R. **2002**. Cholesterol Assimilation by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from the Human Gut. *Applied And Environmental Microbiology*, 68 (9), 4689–4693.
- ❖ Pereira, D.I., McCartney, A.L., Gibson G.R. **2003**. An *in vitro* Study of the probiotic Potential of a Bile-Salt-Hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* Strain, and Determination of its Cholesterol-Lowering Properties. *Applied y Environmental Microbiology* 69(8), 4743-4752.
- ❖ Pérez, C. **2006**. Selección y Caracterización de Bacterias Lácticas con actividad antimicrobiana y fructanolítica a partir de aguamiel. *Instituto Politecnico Nacional Tesis de Maestria*, 1-38
- ❖ Piyawan, S., Bilasoi, S., Supamala, O. **2006**. Antimicrobial susceptibility Antagonistic activity against pathogenic bacteria by human vaginal *lactobacilli*. *Anaerobe* 12, 221–226.
- ❖ Powell, J.E., Witthuhn, R.C., Todorov, S.D., Dicks, L.M.T., **2007**. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kéfir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *International Dairy Journal* 17, 190-198.
- ❖ Rahim, L., Arbakariya, B. **2007**. Optimization of Growth medium for Efficient Cultivation of *Lactobacillus salivarius* using Response Surface Method *Malaysian Journal of Microbiology*, 3(2), 41-47.
- ❖ Reid, G., **1999**. The Scientific Basic for Probiotic Strains of *Lactobacillus*. *Applied and Environmental. Microbiology* 65(9), 3763-3766.
- ❖ Reid, G., Bruce, A.W., Taylor, M. **1995**. Instillation of *Lactobacillus* and stimulation of indigenous organisms to prevent recurrence of urinary tract infections. *Microecol Ther* 23, 32-45.
- ❖ Reid, G., Bruce, A.W. **2001**. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* 183(S1), S77-80.

- ❖ Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J., Henning, B. **2001a**. Oral probiotics can resolve urogenital infections. *Fems Microbiol. Immunol* 30, 49-52.
- ❖ Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., Bruce, A.W. **2001b**. Effect of oral probiotic *Lactobacillus* therapy on the vaginal flora and susceptibility to urogenital infections. *Fems Immunol Med Microbiol*, 36-39.
- ❖ Reid, G., **2006**. Safe and efficacious probiotics: what are they?. *Trends Microbiol* 14, 348-352.
- ❖ Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., Conway, P. **2001**. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* 91, 1059-1066.
- ❖ Roberfroid, M.B. **2000**. Prebiotics and Probiotics are They functional Foods? *Am J. Clin. Nutr* (suppl), 1682s-1687s.
- ❖ Rodriguez, L.R., Teixeira, R. Oliveira, R. **2006**. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal* 32, 135–142.
- ❖ Rojo, B.B., Saenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Larrea, F., Torres, C. **2007**. Coculture-inducible bacteriocin activity of *Lactobacillus plantarum* strain J23 isolated from grape must. *Food Microbiology* 24, 482-491.
- ❖ Rojas, C. Vargas, P. **2008**. Sustituto de preservantes tradicionales en la industria alimentaria. *Tecnología en marcha* 12(2), 9-16.
- ❖ Ruiz-Larrea, F., Bezarez, R., Sáenz, Y., Navarro, L., Díez, L., Zarazaga, M., Torres, C., **2006**. Bacteriocinas para la Estabilización Microbiológica y Reducción de la dosis de SO₂. *Departamento De Agricultura Y Alimentación. Facultad De Ciencias* 51, 26006.
- ❖ Saavedra, J.M., Bauman, N.A., Oung, I., Perman, J.A., Yolken, R.H. **1994** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 344, 1046-9.

- ❖ Salazar, B.C., Montoya, O.I., Valencia, J.U. **2005**. Viabilidad de un aislado nativo de *Lactobacillus brevis* en una bebida láctea fermentada. *Sociedad Latinoamericana de nutricion*, 55 (4), 134-139.
- ❖ Salminen, S., Wright, A., Ouwehand, A. **2004**. Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects. *Edit Marcel Dekker, Inc. New York pp.* 633.
- ❖ Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, R., Fonden, M., Saarela, A. **2002**. Technological challenges for future probiotic foods, *Int. Dairy Journal* 12, 173-182.
- ❖ Sansonetti, P., Ryter, A., Clerc, P., Maurelli, A., Mounor, J. **1986**. Multiplication the *Shigella flexneri* whitin Hela cell: Lysis of phagocyte vacuola and plasmid mediated control hemolysis. *Infect Immun*; 51, 461-9.
- ❖ Sarem, F., Darem-Damerdji, L.O., Nicolas, J.P. **1996**. Comparison of the adherencia of three *Lactobacillus* strain to Caco-2 y Int-407 human intestinal cell lines. *Lett. Appl. Microbiol* 22, 439-442.
- ❖ Savadogo, A., Ouattara, C., Bassole, I.H.M., Traore, S.A. **2006**. Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology* 5 (9), 678-683.
- ❖ Schâr-Zammaretti, P., Dillmann, M.L., Amico, N., Affolter, M., Ubbink J. **2005**. Influence of Fermentation Medium Composition on Physicochemical Surface Properties of *Lactobacillus Ácidophilus*. *Applied And Environmental Microbiology* 71 (12), 8165–8173.
- ❖ Schillinger, H., Kaya, M., Lucke, F.K. **1991**. Behavior of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J. Appl. Bacteriol* 70, 473-478.
- ❖ Schmid, K., Schlothauer, R.C., Friedrich, U., Staudt, C., Apajalahti, J., Hansen, E.B. **2006**. Development of Probioic Food Ingrediens. Probiotics in Food Safety and Human Health. *Taylor & Francis* 2, 35-66.
- ❖ Schrezenmeir, J., De Vrese, M. **2001**. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73(suppl), 361S–4S.

- ❖ Scott, W.J. **2001**. A Review of Probiotics: Are They Really “Functional Foods”? *Aaep Proceedings* 47, 27-31.
- ❖ Sgouras, D., Maragkoudakis, P., Petraki, K., Martinez-Gonzalez, E., Eriotou, B. **2004**. *In Vitro* and *In Vivo* Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology* 70 (1), 518–526.
- ❖ Shu, Q., Lin, H., Rutherford, K.J., Fenwick, S.G., Prasad, J., Gopal, P.K., Gill, H.S. **2000**. Dietary *Bifidobacterium lactis* HN019 enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol* 44, 213- 222.
- ❖ Silveira, M.B., Monereo, S., Molina, B. **2003**. Alimentos funcionales y nutrición óptima. ¿Cerca o lejos? *Rev Esp Salud Pública* 77, 317-331.
- ❖ Soomro, A.H., Masud, T., Anwaar, K. **2002**. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health A Review. *Pakistan Journal of Nutrition* 1(1), 20-24.
- ❖ Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K. **2001**. Market Potencial for Probiotics. *J. Am. Clin Nutri* 73(suppl), 476S–83S.
- ❖ Steinkraus, K.H. **2002**. Fermentations in World Food Processing. *Institute of Food Technologists* 1,23-27.
- ❖ Stern, N.S., Svetoch, B., Eruslanov, V., Perelygin, E.V., Mitsevich, I.P., Mitsevich, V.D., Pokhilenko, V.P., Levchuk, O.E., Svetoch, M., Seal, B. S. **2006**. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* Strain and Purification of Its Bacteriocin, Which Is Inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the Chicken Gastrointestinal System 2006 antimicrob. *Agents chemother* 50 (9), 3111–3116.
- ❖ Strus, M., Kucharska, A., Kukla, M., Katarzyna, M., Heczko, P. **2005**. The *in vitro* activity of vaginal *Lactobacillus* with probiotic properties against *Candida* Infectious. *Diseases in Obstetrics and Gynecology* 13(2), 69-75.

- ❖ Szajewska, H., Kotowska, M., Mrukowicz, J.Z., Armanska, M., Mikolajczyk, W. **2001** Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 138(3), 361-365.
- ❖ Tobajas, **2007**. A kinetic study of reuterin production by *Lactobacillus reuteri* PRO 137 in resting cells. *Biochemical Engineering Journal* 35, (2), 218-225.
- ❖ Todokiri, K., Mukai, T., Sato, S., Toba, T. **2001**. Inhibition of adhesion of food borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strain. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 154-159.
- ❖ Todorov, S.D., Reenen C.A., Dicks, L.M.T. **2004**. Optimization of Bactericin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *J.Gen. Appl. Microbiol* 50, 149-157.
- ❖ Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. **2005**. Growth parameters influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. *Annal of Microbiology* 55(4), 283-289.
- ❖ Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. **2005b**. Effect of Growth Medium on Bacteriocin Production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a Strain Isolated from Boza. *Food Technol. Biotechnol.* 43(2), 165-173
- ❖ Todorov, S.D., Dick, L.M.T. **2005(a)**. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 318–326.
- ❖ Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. **2005**. Optimization of Bacteriocin ST311LD Production by *Enterococcus faecium* ST311LD, Isolated from Spoiled Black Olives. *The Journal of Microbiology* 5, 370-374.
- ❖ Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. **2007**. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolate from BOZA Brazilian. *Journal of Microbiology* 38, 166-172.
- ❖ Toma, M.M., Pokrotnieks, J. **2006**. Probiotics as functional food: microbiological and medical aspects. *Acta Universitatis Latviensis*. 710, 117-129.

- ❖ Uteng, M., Hauge, H.H., Brondz, I., Nissen-Meyer, J., Fimland, G. **2002**. Rapid Two-Step Procedure for Large-Scale Purification of Pediocin-Like Bacteriocins and Other Cationic Antimicrobial Peptides from Complex Culture Medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), 952-956.
- ❖ Vadillo, R., Busscher, H., Mei V., Norde, W. **2005**. Role of *Lactobacillus* cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf B Biointerfaces* 10: 41(1), 33-41
- ❖ Vamanu, E., Vamanu, A., Campeanu, G. **2005**. Isolation of a *Lactobacillus plantarum* strain used for obtaining a product for the preservation of fodders. *African Journal of Biotechnology* 4(5), 403-408.
- ❖ Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., De Vos, P., Kersters, K., Swings, J. **1996**. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol. Rev* 60, 407-438.
- ❖ Vázquez, J.A., González, M.P., Murado, M.A. **2006**. Preliminary tests on nisin and pediocin production using waste protein sources Factorial and kinetic studies. *Bioresource Technology* 97, 605–613.
- ❖ Verluyten, J., Leroy, F., Vuyst, L. **2004**. Influence Of Complex Nutrient Source On Growth Of And Curvacin A, Production By Sausage Isolate *Lactobacillus Curvatus* LTH 1174. *Applied And Environmental Microbiology* 70 (9), 5081–5088.
- ❖ Vicente, J., Wolfenden, A., Torres-Rodríguez, A., Higgins, S., Tellez, G., Hargis, B. **2007**. Effect of a *Lactobacillus* Species-Based Probiotic and Dietary Lactose Prebiotic on Turkey Poultry Performance With or Without *Salmonella enteritidis* Challenge. *Poultry Science Association, Inc* 361-364.
- ❖ Victoria-Leon, T., Guerrero, I., Perez, C. **2005** .Efecto de bacterias ácido lácticas termorresistentes en salchichas cocidas. *Cienc.tecnol. aliment* 5(2), 135-141.

- ❖ Voget, C. **2005**. Conservación de cultivos para la biotecnología y la industria. Curso Cabbio, 1-35.
- ❖ Wee, Y., Kim, J., Yun, J., Ryu, H. **2004**. Utilization of sugar molasses for economical L (+) - Lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus Faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology* 35, 568-573.
- ❖ Wen-Hsin, L., Chin-Fa, H., Li-We, I. **2006**. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. *Food Microbiology* 23,74-81.
- ❖ White, J.S., Hoper, M., Parks, R.W., Clements, W.D.B., Diamond. T., Bengmark, S. **2006**. The probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* species 299 reduces intestinal permeability in experimental biliary Obstruction. *Letters in Applied Microbiology* 42, 19-23.
- ❖ Wodzimierz, G., Olejnik, A., Sip, A. Probiotics, Prebiotics and Antioxidants as Functional Foods. www.actabp 52(3), 665–671.
- ❖ Wold, A.E. **2001**. Immune effects of probiótics. *Scand. J. Nutr* 45, 76-85.
- ❖ Yu, B., Tsen, H.Y. **1993**. *Lactobacillus cell* the rabbit digestive tract and the factor saffecting their distribution. *J. Appl. Bacteriol* 75, 269-275.
- ❖ Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P.C., Savu, L., Vatafu, I., De Vuyst L. **1999**. Purification and Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus ácidophilus* IBB 801. *Journal of Applied Microbiology* 87, 923-931.
- ❖ Zarate, G., Macias, M.E. **2006**. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. *Process Biochemistry* 41, 1779-1785.
- ❖ Zepeda-López, H., Gonzalez-Lugo, M. **1995**. *Escherichia coli* Adherence to HEp-2 Cells with Prefixed Cells. *Journal Of Clinical Microbiology* 33 (5), 1414–1417.

13. ANEXOS

❖ **BUFER DE FOSFATOS SALINO (PBS)**

NaCl 8.0 gr

KCl 0.2 gr

Na₂HPO₄ 1.44 gr

KH₂PO₄ 0.24 gr

Disolver en 800 ml de agua destilada. Ajustar pH 7.2 .Aforar a un litro.
Mantener a T° ambiente.

Calentar un poco hasta disolver la sal. Dejar enfriar y guardad a 4°C

TINCION DE GRAM :

❖ **COLORANTE YODO GRAM**

Yodo 1g

Yoduro de potasio 2 gr

H₂O destilada 100 ml

Mezcle en un mortero, el yodo y el yoduro de potasio moler finamente y añadir una pequeña cantidad de H₂O para lavar el material, agregar el resto de agua

❖ **COLORANTE SAFRANINA GRAM**

Safranina 0.25 gr

Etanol 95% 10 ml

H₂O destilada 100 ml

Disolver la safranina en el alcohol, mezclar bien y disolver. Filtrar la solución para su uso.

❖ ALCOHOL/ACETONA V/V

Alcohol 95% 50 ml

Acetona 50 ml

❖ COLORANTE CRISTAL- VIOLETA GRAM

SOLUCION A

C. VIOLETA 2.0 gr

ETANOL 95% 20 ml

SOLUCION B

Oxalato de amonio 0.8 g

H₂O destilada 80 ml

Se mezclan las 2 soluciones 1 en otra hasta disolver

AGAR MRS AGAR MAN, ROGOSA Y SHARPE (SELECTIVO, OXOID)

Peptona 10 g

Extracto de carne 8 gr

Extracto de levadura 4 gr

D-Glucosa 20 gr

Acetato de sódio 5 gr

Citrato triamonico 2 gr

Sulfato de magnésio 0.2 gr

Sulfato Manganeso 0.05 gr

Agar-Agar 17 g

Tween-80 1 ml/Lt

MEDIO DE CULTIVO MSB

Glucosa 20 g/L

Triptona 20 g/L

Melaza 20 g/L

KHPO₄ 5 g/L

Leche de soya 100 g/L

MEDIO DE CULTIVO MRS MODIFICADO (MRS*)

Extracto de levadura 7.5 g/L

Glucosa 20g/L

Fosfato dipotasico 2 g/L

Triptona 12.5 g/L

Cianocobalamina 1.0mg/L

