



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
**UNIDAD IZTAPALAPA**  
**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD**  
**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**TESIS**

**" Control biológico de hongos micotoxigénicos con bacterias  
ácido lácticas "**

Para obtener el grado de  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en Biotec. Ruben Espinosa Salgado**

Matricula: 2163807852

Director:

**Dr. Gerardo Saucedo Castañeda**

Asesoras:

**Dra. Isabelle Perraud-Gaime**

**Dra. Angélica Román Guerrero**

Iztapalapa, Ciudad de México, 11 de mayo del 2022



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00264

Matrícula: 2163807852

Control biológico de hongos micotoxigénicos con bacterias ácido lácticas.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 11 del mes de mayo del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO  
DR. OSWALDO GUZMAN LOPEZ  
DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ  
DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

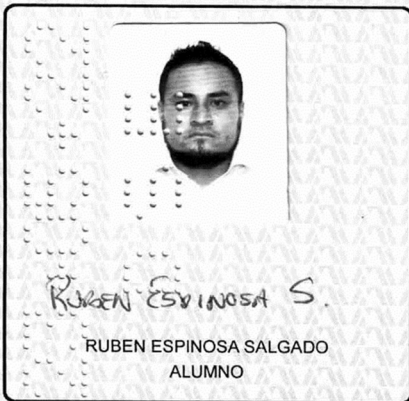
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

DE: RUBEN ESPINOSA SALGADO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

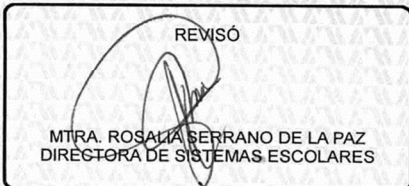
*Aprobado*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



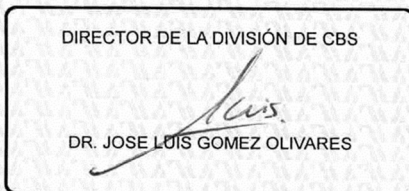
RUBEN ESPINOSA S.

RUBEN ESPINOSA SALGADO  
ALUMNO



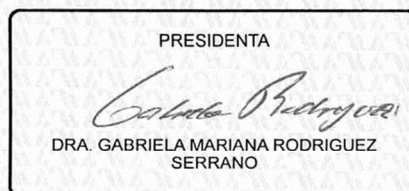
REVISÓ

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES



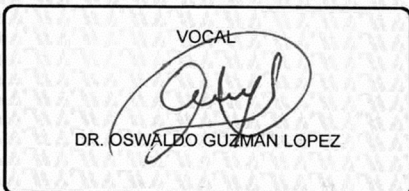
DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES



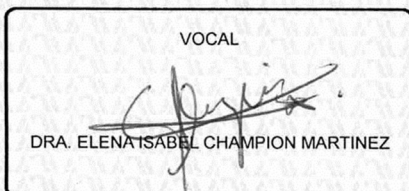
PRESIDENTA

DRA. GABRIELA MARIANA RODRIGUEZ SERRANO



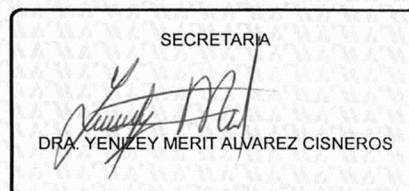
VOCAL

DR. OSWALDO GUZMAN LOPEZ



VOCAL

DRA. ELENA ISABEL CHAMPION MARTINEZ



SECRETARIA

DRA. YENIZEY MERIT ALVAREZ CISNEROS

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, con la referencia 001466”

RES agradece el apoyo de la beca CONACYT (CVU 613157) y al proyecto (ANGELICA 273656) de CONACYT México y Agence Nationale de la Recherche ANR (Agencia Nacional para Investigación), Franc

## **Agradecimientos**

Agradezco al Dr. Gerardo Saucedo por brindarme la oportunidad de colaborar en su laboratorio y permitirme desarrollar mi tesis de doctorado, así como por la formación que me dio durante mi estancia en la UAMI.

A la Dra. Gabriela Rodríguez y la Dra. Isabel Perraud-Gaime por su apoyo y comentarios durante el desarrollo de mi tesis.

A mis compañeros de la PP4, por sus comentarios en los seminarios, y brindarme el apoyo para operar de manera adecuada los equipos.

A mi familia por apoyarme y alentarme a culminar con esta tesis de doctorado.

A Victoria por todo el apoyo incondicional, por ayudarme en los momentos más difíciles.

## Resumen

La pérdida de alimentos causada por la contaminación de microorganismos es una problemática importante para atender la demanda creciente de la población humana. Específicamente la contaminación por hongos es un tema de interés puesto que producen micotoxinas a las que se les atribuye diversas enfermedades. Para resolver la problemática antes mencionada se propone el uso de bacterias ácido lácticas (BAL) como antagonistas del crecimiento del hongo *Aspergillus carbonarius*. En el trabajo se busca potenciar el efecto antifúngico de cepas de BAL mediante la modificación de la formulación del medio de cultivo, así como identificar metabolitos con actividad antifúngica.

En una primera etapa se realizó un análisis de los productos de fermentación de las BAL. Se encontró que son homofermentativas, por producir principalmente ácido láctico con bajas concentraciones de ácido propiónico, etanol y en el caso de la cepa BAL 31 también se produjo ácido butírico. Se determinó que la mayor actividad antifúngica se presentó cuando el sobrenadante libre de células fue obtenido entre las 72 y 96 h de cultivo de las BAL bajo condiciones anaerobias. En una segunda fase se evaluó la actividad antifúngica cuando se modifican la cantidad de fuente de nitrógeno y algunos factores nutricionales. Se encontró que la BAL 7 de México y la BAL 31 de Costa de Marfil son las que presentan mayor actividad antifúngica, también se encontró que tanto el extracto de levadura y citrato de amonio pueden ser eliminados del medio de cultivo sin afectar el crecimiento y la actividad antifúngica. Por último, el cloruro de calcio tiene un efecto negativo en la inhibición y el cloruro de sodio no tiene ningún efecto sobre la inhibición.

La última sección corresponde al estudio del efecto de la adición de polioles al medio de cultivo MRS sobre la producción de metabolitos con actividad antifúngica. La mayor inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* se obtuvo cultivando *L. plantarum* MZ809351 en presencia de xilitol y glicerol. En estas condiciones, además del ácido 9-octadecenoico, se identificaron 3 dicetopiperazinas o dipéptidos cíclicos, entre ellos ciclo (Leu-Leu), ciclo (Pro-Gly) y ciclo (Val-Phe), compuestos que han sido relacionados con actividad antifúngica. Por otro lado, la adición de xilitol y glicerol al caldo MRS redujo el contenido de ocratoxina A (OTA) a 56.8 y 54.7%, respectivamente. Este estudio muestra el potencial para usar *L. plantarum* MZ809351 como agente de biocontrol.

## Abstract

The lost food caused by the contamination with microorganisms is an important problem to solve human survival. The contamination by fungus is a topic of great interest because the fungus biosynthesized mycotoxins associated with several diseases. In this sense to give solutions to the problem mentioned before, in this thesis, the use of lactic acid bacteria as antagonists of the growth of *Aspergillus carbonarius* is proposed. The work focuses on enhancing the antifungal effect of LAB modifying the formulation of the culture medium and identifying metabolites with antifungal activity.

Firstly, an analysis of the fermentation products of the LAB was carried out. The strains were characterized as homofermentative, because mainly produced lactic acid, and a low concentration of propionic acid, ethanol, and LAB strain 31 (MZ809351) also produced butyric acid. On the other hand, it was found that the highest antifungal activity occurred when the cell-free supernatant was obtained between 72 and 96 h of LAB culture under anaerobic conditions.

Secondly, we analyzed the effect of the concentration of the nitrogen source and some nutritional factors. LAB strains 7 from Mexico and 31 from the Ivory Coast exhibited the highest antifungal activity, moreover, it was found that both yeast extract and ammonium citrate can be eliminated from the culture medium without affecting both growth and antifungal activity. Lastly, this part shows the antifungal activity was reduced when calcium chloride was added to culture media and was not affected by the presence of sodium chloride.

The last stage corresponds to the analysis of the results of adding polyols to the MRS culture medium on the production of metabolites with antifungal activity. The highest growth inhibition of *A. carbonarius* was obtained by cultivating *L. plantarum* MZ809351 (LAB 31) in the presence of xylitol and glycerol. Under these conditions, in addition to 9-octadecenoic acid, 3 diketopiperazines or cyclic dipeptides were identified, including cyclo (Leu-Leu), cyclo (Pro-Gly) and cyclo (Val-Phe), these compounds have been related to microbial antifungal activity. On the other hand, adding xylitol and glycerol to the MRS broth reduced the Ochratoxin A (OTA) content to 56.8 and 54.7%, respectively. This study shows the potential for using *L. plantarum* as a biocontrol agent.

## Índice de contenido

1. Introducción.....	1
2. Revisión bibliográfica .....	4
2.1 Contaminación de alimentos .....	4
2.2 Microorganismos responsables de la contaminación de alimentos .....	5
2.2.1 Crecimiento microbiano .....	5
2.3 Hongos micotoxigénicos .....	6
2.3.1. <i>Aspergillus</i> .....	7
2.3.2 <i>Penicillium</i> .....	7
2.3.3 <i>Fusarium</i> .....	8
2.4 Micotoxinas .....	8
2.4.1 Aflatoxinas .....	8
2.4.2 Ocratoxinas.....	9
2.5 Métodos para la conservación de alimentos .....	10
2.5.1 Métodos físicos para la conservación de alimentos.....	10
2.5.2 Métodos químicos para la conservación de alimentos .....	11
2.5.3 Métodos biológicos para la conservación de alimentos .....	12
2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL).....	12
2.7 Mecanismos de control biológico.....	14
2.7.1 Competencia por nutrientes y espacio .....	14
2.7.2 Compuestos antifúngicos producidos por BAL .....	14
2.7.3 Bacteriocinas .....	16
3. Justificación.....	19

4. Hipótesis.....	20
5.1 Objetivo General.....	20
5.2 Objetivos específicos.....	20
6. Estrategia de trabajo .....	21
7. Análisis del crecimiento de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 y del efecto del pH, O <sub>2</sub> y duración de cultivo sobre la actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas. ....	23
7.1 Resumen .....	23
7.2 Introducción: Antecedentes directos .....	23
7.3 Materiales y métodos.....	25
7.3.1 Microorganismos .....	26
7.3.2 Activación y resiembra de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 .....	26
7.3.3 Cultivo de bacterias lácticas .....	27
7.3.4 Determinación de la inhibición del crecimiento fúngico en medios envenenados.....	27
7.3.5 Prueba preliminar de crecimiento de <i>A. carbonarius</i> Ac 162 .....	27
7.3.6 Producción de ácidos orgánicos .....	28
7.3.7 Análisis estadístico .....	28
7.4 Resultados y discusión .....	28
7.4.1 Parámetros cinéticos del crecimiento de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162.....	28
7.4.2 Efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad antifúngica del SLC de las BAL. ....	31
7.4.3 Perfiles de producción de ácidos orgánicos.....	32
7.4.4 Comparación del efecto antifúngico de los sobrenadantes de las BAL producidos en condiciones aerobias y anaerobias.....	33
7.4.5 Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de los SLC de las BAL.....	34
7.5 Conclusiones.....	35



8. Efecto de factores nutricionales y extracto de levadura sobre la actividad antifúngica del SLC de bacterias ácido lácticas .....	37
8.1 Resumen .....	37
8.2 Introducción.....	37
8.3 Materiales y métodos.....	38
8.3.1 Microorganismos .....	38
8.3.2 Cultivo de bacterias lácticas .....	39
8.3.3 Cultivo de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 y Ac. 89.....	40
8.3.4 Determinación de la inhibición del crecimiento fúngico en medios envenenados.....	40
8.3.5 Comparación preliminar entre las BAL de México y Costa de Marfil .....	40
8.3.6 Cuantificación de ácido láctico .....	41
8.3.7 Análisis estadístico .....	41
8.4 Resultados y discusión .....	41
8.4.1 Comparación de la inhibición de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 y Ac. 89 por BAL de Costa de Marfil y México. ....	41
8.4.2 Efecto de la variación de extracto de levadura sobre el metabolismo de BAL .....	42
8.4.3 Efecto de la adición de citrato de amonio sobre la actividad antifúngica .....	47
8.4.4 Efecto de la adición de cloruro de calcio sobre la actividad antifúngica.....	48
8.4.5 Efecto de la adición de cloruro de sodio sobre la actividad antifúngica .....	49
8.5 Conclusiones.....	50
9. Polyols induce the production of antifungal compounds by <i>Lactobacillus plantarum</i> ....	52
9.1 Abstract.....	52
9.2 Introduction .....	52
9.3 Materials and methods.....	54
9.3.1 Molecular identification of LAB strains.....	54

9.3.2 Cultivation of LAB and production of a cell-free culture filtrate (CCF) .....	54
9.3.3 Determination of polyols by HPLC.....	55
9.3.4 Antifungal activity assays.....	56
9.3.5 Determination of OTA by HPLC .....	57
9.3.6 Identification of antifungal compounds.....	58
9.3.7 Antifungal activities of concentrated samples (eluate 2).....	59
9.3.8 Statistical analysis .....	59
9.4 Results .....	59
9.4.1 Molecular identification of LAB strains.....	59
9.4.2 Growth inhibition of <i>Aspergillus carbonarius</i> Ac 162 and consumption of polyols ..	60
9.4.3 Determination of the production of OTA.....	62
9.4.4 Evaluation of the antifungal activity extracts.....	63
9.4.5 Identification of antifungal compounds.....	65
9.5 Discussion.....	66
9.5.1 Consumption of polyols and their effect on antifungal activity .....	66
9.5.2 OTA production by <i>A. carbonarius</i> .....	67
9.5.3 Synergistic effect of antifungal compounds .....	67
9.6 Conclusion.....	68
10. Conclusión general .....	68
11. Referencias .....	71
12 Anexos.....	79
Medios de cultivo para hongos.....	79
Curvas patrón de crecimiento de BAL .....	80
Curvas patrón para la cuantificación de polioles.....	81

Curvas patrón para la cuantificación de compuestos producidos por BAL .....	82
Secuenciación de bacterias ácido lácticas .....	83
Publicaciones y presentaciones en congresos.....	88

## Índice de figuras

Figura 2.1. Estructura química de las principales aflatoxinas contaminantes de alimentos (Murphy et al., 2006).....	9
Figura 2.2. Estructura química de la OTA (Malir et al., 2016) .....	10
Figura 2.3. Compuestos antimicrobianos producidos durante el metabolismo de BAL. Modificación de la propuesta de: Siedler et al., 2019 .....	14
Figura 2.4. Estructura química general de las 2, 5-dicetopiperazinas. R <sup>1</sup> y R <sup>2</sup> son los radicales de las cadenas laterales de las variaciones de las distintas ocratoxinas (P. de Carvalho & Abraham, 2012). .....	16
Figura 2.5. Estructura peptídica del lantibiotico nisina. Obtenido de: (Kleerebezem & Quadri, 2001).....	17
Figura 2.6. Estructura peptídica de la pediocina A1.....	17
Figura 2.7. Estructura peptídica de la Lisostafina .....	18
Figura 6.1 Estrategia experimental.....	22
Figura 7.1. Tasa de producción de CO <sub>2</sub> de <i>A carbonarius</i> durante el crecimiento en columnas empacadas con perlas de poliacrilamida hidratadas con medio Czapek con extracto de levadura. ....	29
Figura 7.2. Tasa de producción de CO <sub>2</sub> durante el crecimiento en columnas empacadas con perlas de poliacrilamida hidratadas con medio Czapek con extracto de levadura de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162. Los cuadros representan los valores experimentales y la línea continua el ajuste al modelo .....	30
Figura 7.3 Crecimiento radial de <i>Aspergillus carbonarius</i> Ac. 162 en medio Czapek con extracto de levadura durante 72 h a 30 °C.....	30
Figura 7.4. Efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células de bacterias ácido lácticas de Costa de Marfil.....	32
Figura 7.5. Producción de ácidos orgánicos por bacterias ácido lácticas, cultivadas en medio de Man Rogosa y Sharpe durante 96 h a 30 °C. ....	33

Figura 7.6. Efecto de la presencia de O <sub>2</sub> en el cultivo de BAL de Costa de Marfil sobre la actividad antifúngica de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162. Las barras grises corresponden a condiciones anaerobias y las barras blancas a los cultivos aerobios. ....	34
Figura 7.7. Efecto de la variación de pH sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de bacterias ácido lácticas de Costa de Marfil. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	35
Figura 8.1. Inhibición de crecimiento radial (48 h) causada por los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de bacterias ácido lácticas (31, 3, 7 y 23) sobre <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 (barras grises) y <i>A. carbonarius</i> DO89 (barras blancas). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	42
Figura 8.2. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Gompertz (línea continua) para las cepas 7 (A) y 31 (B) a diferentes concentraciones de extracto de levadura. ....	43
Figura 8.3. Crecimiento radial de <i>A. carbonarius</i> Ac 162 y DO89 utilizando los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 7 y 31 variando la concentración de extracto de levadura (0, 2.5, 5 Y 7.5 g/L) del medio de Man Rogosa y Sharpe. ....	46
Figura 8.4. Efecto de la variación de la concentración de extracto de levadura sobre la inhibición del crecimiento radial de los sobrenadantes libres de células del cultivo de las BAL 31 (a) y 7 (b) en las dos cepas de <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 y Ac. 089. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	47
Figura 8.5. Efecto de la variación de la concentración de citrato de amonio sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b) en las dos cepas de <i>A. carbonarius</i> estudiadas. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	48
Figura 8.6. Efecto de la variación de la concentración de cloruro de calcio sobre la actividad antifúngica contra <i>A. carbonarius</i> Ac. 162 y Ac. 89 de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	49
Figura 8.7. Efecto de la variación de la concentración de cloruro de sodio sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (P < 0.05). ....	50

Fig. 9.1 Inhibition of *A. carbonarius* growth (%) using five LAB strains. The LAB studied were *Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34) isolated in the Ivory Coast and *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23) isolated in Mexico. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory. The LAB strains were cultured with xylitol, X; glycerol, G; mannitol, M; sorbitol, S; control, C (PDA 2X and MRS broth). The white bars represent significant differences (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) for the interactions (strain and polyol). The error bars with *L. plantarum* MZ809351 (31) in the presence of glycerol and xylitol did not overlap with the other conditions assayed, indicating statistically significant differences ( $p < 0.05$ )..... 61

Fig. 9.2. Consumption of polyols (%) in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broths by five lactic acid bacteria. *Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34) were isolated in the Ivory Coast and *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23) were isolated in Mexico. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory.... 62

Fig. 9.3. Production of OTA from the poisoned plate cultures of *Aspergillus carbonarius* Ac. 162 with the culture cell filtrate of *L. plantarum* MZ809351 (31) fermented with different polyols. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistically significant differences ( $p < 0.05$ )..... 63

Fig. 9.4. Growth inhibition of *A. carbonarius* using the poisoned food technique of eluate 1 (negative control) of treatments with *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) cultured in the presence of xylitol, X; and glycerol, G..... 64

Fig. 9.5 Inhibition of *A. carbonarius* growth (%) using different volumes (15, 45 and 90  $\mu$ L) of concentrated samples of eluate 2 from *L. plantarum* MZ809351 (31) (cultured with xylitol, X; and glycerol, G) after culturing for 72 h..... 64

Fig. 9.6 GC–MS chromatograms of concentrated samples (eluate 2) from *L. plantarum* MZ809351 (31) cultured in the presence of xylitol and glycerol. The chromatograms for the MRS broth without inoculation are shown as black lines, while the dashed lines represent the concentrated samples and the dotted lines represent the strains cultivated in MRS broth without polyols. .... 65

Fig. 9.7 Chemical structures and mass spectra of identified antifungal compounds: ciclo (Val-Phe) (a), 9 octadecenoic acid (b), cyclo (Leu-Leu) (c) and cyclo (Pro-Gly) (d)..... 66

Figura A1. Curvas de crecimiento de las BAL 7 y 31 de densidad óptica vs UFC/mL ..... 80

Figura A2. Curvas de calibración generadas para la cuantificación de polioles. .... 81

Figura A3. Curvas de calibración generadas para la cuantificación de ácidos orgánicos y etanol. .... 82

## Índice de tablas

Tabla 2.1. Ecuaciones empíricas para modelar el crecimiento microbiano. ....	6
Tabla 8.1. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz del crecimiento de las BAL 7 y 31 a diferentes concentraciones de extracto de levadura.....	44
Tabla 8.2. Producción de ácido láctico por BAL en medio MRS modificado con diferentes concentraciones de extracto de levadura después de 96 h de cultivo. ....	44
Table 9.1. Retention times for polyols detected postfermentation by HPLC using an isocratic method based on a standard curve (0.5-10 g/L). ....	56
Tabla A1. Composición del medio CYA.....	79
Tabla A2. Composición del medio Czapeck .....	79
Tabla A3. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de densidad óptica vs UFC/mL para las BAL 7 y 31. ....	80
Tabla A4. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de concentración vs área para la cuantificación de polioles. ....	81
Tabla A5. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de concentración vs área para la cuantificación de metabolitos producidos por BAL.....	82



## Glosario de abreviaturas

ANOVA	Análisis de la varianza
BAL	Bacterias ácido lácticas
CEP	Campos eléctricos pulsados
CG-MS	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CIIC	Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CYA	Agar Czapek-levadura (siglas en inglés)
ODS	Octadecil-silano
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
LAB	Lactic acid bacteria (siglas en inglés)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
MRS	Man Rogosa y Sharpe
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NIST	Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (siglas en inglés)
OTA	Ocratoxina A
PDA	Agar papa dextrosa
PTFE	Politetrafluoroetileno
SLC	Sobrenadante libre de células
SPE	Extracción en fase sólida
UFC	Unidades formadoras de colonias

# 1. Introducción

El deterioro y contaminación de alimentos causado por microorganismos es un problema que no ha sido atendido de manera adecuada. Los métodos físicos y químicos utilizados tienen efectos secundarios adversos sobre el producto y los consumidores. Al mismo tiempo, algunos microorganismos patógenos son capaces de sobrevivir a las condiciones fisicoquímicas extremas utilizadas en la industria alimentaria, propagándose por el agua y el aire (Snyder & Worobo, 2018). Particularmente, se ha reportado que la presencia de hongos genera pérdidas económicas anuales de hasta el 25% (Marin et al., 2013).

Los hongos bajo condiciones de estrés ocasionadas por la modificación de factores físicos y químicos activan su metabolismo secundario y producen diversos compuestos, entre ellos las micotoxinas. Estos metabolitos son un conjunto de moléculas de bajo peso molecular que pueden causar enfermedades o la muerte en diversos organismos incluyendo el ser humano (Zain, 2011). Dentro de las principales micotoxinas reportadas se encuentran: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas y ocratoxinas (Djossou et al., 2011).

La ocratoxina A (OTA) resulta ser muy tóxica para el ser humano. La OTA se encuentra clasificada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) como posible carcinógeno humano y está relacionada con problemas nefrotóxicos, teratogénicos e inmunotóxicos (Hope & Hope, 2012). La OTA se ha encontrado en: frutos secos, cacao, especias, productos cárnicos, café y bebidas (Eskola et al., 2019; Heussner & Bingle, 2015).

El café es uno de los productos agrícolas más comercializados a nivel mundial. América Latina produce el 60%, seguido por Asia 24% y África con el 16% (Aksoy & Beghin, 2004). *Aspergillus carbonarius* es el principal hongo contaminante de café Robusta y *Aspergillus westerdijkiae* de la variedad Arabica, la contaminación por estos hongos ocurre principalmente en la etapa de secado (Taniwaki et al., 2018). En México el café es producido en 15 estados, siendo Chiapas el principal productor y aproximadamente 96% del café producido es de la variedad Arabica (Elms, 2019). Esta información justifica la importancia que tiene el atender el problema de contaminación en alimentos como el café.

El problema de contaminación ocasionada por hongos se ha controlado utilizando métodos químicos y físicos (Lee et al., 2008). Sin embargo, estas estrategias están siendo cada vez menos usadas debido a varias razones: desarrollo de nuevos patógenos, pérdida de efectividad dado que los patógenos desarrollan resistencia, incremento de los niveles residuales en el suelo y problemas de toxicidad en humanos (Dukare et al., 2019; Parveen et al., 2016).

Actualmente, bajo un escenario de cambio climático y el daño potencial al ambiente y a la salud humana se ha promovido el desarrollo de agricultura sostenible y la aplicación de técnicas de control biológico de patógenos (Wu et al., 2015) mediante el uso de microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS) y sus metabolitos (Kumar et al., 2019).

El control biológico se define como la reducción del crecimiento o metabolismo de un patógeno en su estado activo o latente, logrado de forma natural por introducción en masa de uno o más organismos antagonistas (Parveen et al., 2016), dentro de estos microorganismos antagonistas están las bacterias ácido lácticas (BAL) caracterizadas como cocos o bastones Gram-positivos, aerotolerantes, capaces de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico, con un metabolismo homofermentativo o heterofermentativo (Djadouni & Kihal, 2012). Las BAL ofrecen ventajas sobre los fungicidas sintéticos: no producen residuos tóxicos, son amigables con el medio ambiente, de fácil manejo y económicas (Dukare et al., 2019).

Los mecanismos de inhibición de las BAL son diversos: producen un amplio rango de compuestos inhibitorios; compiten por nutrientes esenciales; disminuyen el potencial oxidorreductor por mencionar algunos (Djadouni & Kihal, 2012). Se han reportado una gran cantidad de compuestos antifúngicos (péptidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos de bajo peso molecular, etc.) producidos por BAL (Siedler et al., 2019), con múltiples mecanismos de acción, dependiendo de su estructura química (Dalié et al., 2010). Por ejemplo, los ácidos orgánicos favorecen la liposolubilidad de la membrana y provocan la ruptura celular del patógeno, mientras que el peróxido de hidrógeno provoca daño celular debido a su carácter oxidante.

Algunos parámetros que modulan la capacidad antifúngica de las BAL, incluyen: temperatura, tiempo de incubación, medio de crecimiento, pH y factores nutricionales como el extracto de levadura, glucosa, cloruro de sodio y cloruro de calcio (Dalié et al., 2010; Matevosyan et al., 2019). Existen trabajos en los que se menciona que la presencia de polioles (glicerol, lactitol, eritol, sorbitol y manitol) en el medio de cultivo de las BAL favorece la producción de compuestos antifúngicos. Tal es el caso de *Lactobacillus paracasei* donde el xilitol así como su derivado galactosídico, incrementan la actividad antifúngica y aumenta el espectro antifúngico hacia otros microorganismos (Lipińska et al., 2016).

Con base en la información anterior, el control biológico con BAL es una alternativa viable para la conservación de alimentos, resulta de interés identificar los metabolitos responsables de ejercer el control biológico, para tener información que ayude a establecer los mecanismos de inhibición. También es interesante evaluar el efecto de parámetros como el pH, tiempo de incubación, adición de compuestos, así como la presencia de factores nutricionales que puedan mejorar la capacidad antifúngica de las BAL.

Así, en el capítulo 7 se presentan pruebas preliminares, incluye un análisis de la respirometría de *A. carbonarius* Ac. 162, el efecto del pH, tiempo de cultivo y presencia de O<sub>2</sub> en el cultivo de bacterias ácido lácticas, así como los principales metabolitos producidos.

En el capítulo 8 se explica cómo se afecta la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 cuando se modifican la cantidad de fuente de nitrógeno y algunos factores nutricionales (citrato de amonio, cloruro de calcio y cloruro de sodio).

El capítulo 9 evalúa el efecto de la adición de polioles al medio de cultivo MRS sobre la producción de metabolitos con actividad antifúngica. Se estudiaron cepas de Costa de Marfil (J, 31 y 34) y de México (3 y 23), las variables respuesta monitoreadas fueron la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 y la producción de OTA. También se identificaron metabolitos secundarios con actividad antifúngica cuya producción es estimulada por la adición de polioles.

## 2. Revisión bibliográfica

Las BAL han sido ampliamente utilizadas para la conservación de diversos alimentos de consumo humano y animal, así como agentes de control biológico contra microorganismos patógenos. Su uso para evitar el crecimiento de hongos productores de micotoxinas resulta una alternativa prometedora para evitar la contaminación de productos de gran importancia económica como el café, dado que su producción enfrenta problemas debidos a enfermedades como la roya y a la contaminación durante su procesamiento.

### 2.1 Contaminación de alimentos

La prevención de la contaminación de alimentos ha sido uno de los mayores desafíos de la humanidad. Aproximadamente un tercio de los alimentos producidos a nivel mundial son contaminados y desechados (Odeyemi et al., 2020). Además, las pérdidas de alimentos representan un desaprovechamiento de recursos (tierra, agua, energía e insumos) y conducen a la generación de emisiones de CO<sub>2</sub> (Rawat, 2015).

La contaminación de alimentos es definida como un cambio en su calidad que los hacen indeseables o no aptos para su consumo. El deterioro en un producto alimenticio puede ser por daño físico o cambios químicos (oxidación, cambios de color), dichos cambios se ven reflejados en las características sensoriales y en ocasiones son el resultado del metabolismo microbiano que utiliza los alimentos como fuente de nutrientes (Gram et al., 2002). Por ejemplo, algunos microorganismos liberan enzimas proteolíticas que degradan las proteínas de los alimentos, liberando aminoácidos de sabor desagradable y en presencia de oxígeno, los aminoácidos son transformados en ácidos orgánicos y amonio (Amit et al., 2017).

Los factores que influyen en la contaminación y degradación de alimentos están categorizados como intrínsecos que son inherentes de los alimentos (actividad de agua, pH, contenido de nutrientes, estructura biológica), y extrínsecos (temperatura de almacenamiento, humedad del entorno, gases atmosféricos y actividad microbiana) (Majumdar et al., 2018).

## 2.2 Microorganismos responsables de la contaminación de alimentos

Los microorganismos causantes de contaminación incluyen procariotas (bacterias) y eucariotas (hongos y levaduras). A menudo se identifican varias especies en un solo alimento en mal estado, pero también es posible encontrar solo una especie (Rawat, 2015).

Las bacterias de descomposición son microorganismos que causan el deterioro de los alimentos y desarrollan olores, sabores y texturas desagradables. Las bacterias de descomposición normalmente no causan enfermedades. Sin embargo, cuando se consumen en alta concentración, pueden causar trastornos gastrointestinales. Los géneros de bacterias que se encuentran con mayor frecuencia en el deterioro de alimentos son: *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Clostridium* (Böhme et al., 2011).

Las levaduras se pueden clasificar en dos categorías principales: fermentativas y oxidativas. Las levaduras fermentativas son facultativas anaeróbicas que generan etanol y dióxido de carbono a partir de azúcares simples. Los géneros representativos en alimentos contaminados incluyen *Saccharomyces* (productos de frutas procesadas) y *Zygosaccharomyces*. Las levaduras oxidativas metabolizan ácidos orgánicos y alcoholes. *Mycoderma*, *Candida*, *Pichia* y *Debaryomyces* son los principales géneros de levaduras oxidativas que contaminan los alimentos (Majumdar et al., 2018).

Los hongos son agentes biológicos ubicuos capaces de crecer en un amplio rango de temperaturas. Son aerobios obligados con un metabolismo oxidativo. Los géneros representativos que contaminan alimentos son: *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium*, *Eurotium* y *Byssochlamys* (da Cruz Cabral et al., 2013).

### 2.2.1 Crecimiento microbiano

El crecimiento microbiano comprende diversos procesos fisiológicos: aumento de masa y multiplicación celular, supervivencia y muerte, adaptación, mutaciones, interacciones biológicas y formación de productos (Flickinger & Panikov, 2010). Todos estos procesos son representados a través de una curva de crecimiento. En un sistema biológico la curva comprende varias fases: adaptación, crecimiento exponencial, estacionaria y muerte. Existen

diversas funciones sigmoidales utilizadas para modelar el crecimiento microbiano (Tabla 2.1), dichas funciones empíricas son ajustadas a los perfiles de crecimiento por regresión no lineal (Mitchell et al., 2004)

Tabla 2.1. Ecuaciones empíricas para modelar el crecimiento microbiano.

Ecuación	Forma diferenciada	Forma integrada
Lineal	$\frac{dX}{dt} = k$	$X = k t + X_0$
Exponencial	$\frac{dX}{dt} = \mu X$	$X = X_0 e^{\mu t}$
Logística	$\frac{dX}{dt} = \mu X \left(1 - \frac{X}{X_m}\right)$	$X = \frac{X_m}{1 + \left(\left(\frac{X_m}{X_0}\right) - 1\right) e^{-\mu t}}$
Gompertz	$\frac{dX}{dt} = k X \ln\left(\frac{X_m}{X}\right)$	$X = X_m e^{-X_0 e^{-k t}}$

$X$  es la concentración de biomasa microbiana,  $t$  es el tiempo,  $k$  constante de la tasa de crecimiento,  $\mu$  es la tasa de crecimiento específica,  $X_0$  es la biomasa inicial,  $X_m$  es la biomasa microbiana máxima posible.

Para estudiar el crecimiento microbiano existen métodos directos como el conteo celular, la estimación de biomasa o el volumen celular; e indirectos que involucran cualquier parámetro físico o químico correlacionado de manera proporcional al crecimiento (densidad óptica o producción de algún metabolito). La respirometría a través de la medición de CO<sub>2</sub> con sensores infrarrojos es un método muy utilizado para analizar el crecimiento biológico en tiempo real (Keblys et al., 2004).

### 2.3 Hongos micotoxigénicos

Los hongos micotoxigénicos se clasifican en hongos de campo y hongos de almacenamiento en función de sus requisitos ecológicos para desarrollarse (Adeyeye, 2016). Estos microorganismos pueden crecer dentro de un amplio rango de valores de actividad de

agua ( $a_w$ ): pH y temperatura. Su crecimiento incluye dos fenómenos, la germinación de esporas y la proliferación de micelio, durante los cuales se pueden producir exoenzimas (lipasas, proteasas y carbohidrasas). Las exoenzimas transforman las propiedades sensoriales de los alimentos, o bien, producen micotoxinas potencialmente peligrosas para la salud del consumidor (Dagnas & Membré, 2013). La producción de micotoxinas se estimula por factores ambientales como la ubicación geográfica, métodos agrícolas y la susceptibilidad de los productos a la penetración de hongos durante los períodos de almacenamiento y procesamiento (Adeyeye, 2016). Entre los principales hongos micotoxigénicos se encuentran los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*.

### 2.3.1. *Aspergillus*

*Aspergillus* es un género de hongos causantes de enfermedades tanto por infección como por intoxicación. La infección conocida como aspergilosis es una enfermedad invasiva donde los conidios crecen en los bronquiolos y alveolos del huésped y en ocasiones llega a invadir otros órganos, *A. fumigatus* es la especie frecuentemente encontrada como responsable de esta enfermedad. Por otro lado se ha reportado que la intoxicación por micotoxinas causa daños en el hígado y riñón (Bennett, 1992). Las principales especies productoras de micotoxinas de este género son: *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ocharecus* y *A. carbonarius* (Murphy et al., 2006).

### 2.3.2 *Penicillium*

Las especies de *Penicillium* se asocian a los quesos madurados, pero también frecuentemente con el deterioro de alimentos. Producen una amplia variedad de micotoxinas y metabolitos secundarios dentro de los cuales se encuentran: la patulina, la ocratoxina, la citrinina, el ácido penicílico, el ácido ciclopiazónico, la citreoviridina y el penitremo que pueden provocar diferentes respuestas tóxicas en humanos y animales. (Barkai-Golan, 2008). Algunos ejemplos de las principales especies micotoxigénicas de este género son: *P. crustosum*, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. roqueforti*, *P. viridicatum*, *P. commune*, *P. aurantiogriseum*, *P. citrinum*, y *P. verrucosum* (Kebly et al., 2004).



### 2.3.3 *Fusarium*

Este género se encuentra con frecuencia en cereales y sus derivados. Algunas micotoxinas producidas por *Fusarium* son los tricotecenos, las fumonisinas y la zearalenona (Oueslati et al., 2011). Las principales especies micotoxigénicas son: *F. poae*, *F. cerealis*, *F. equiseti*, *F. sporotrichioides*, *F. triseineturn*, *F. acuminatum*, *F. subglutinans*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *F. semitectum* y *F. proliferatum* (Bottalico & Perrone, 2002).

## 2.4 Micotoxinas

Los metabolitos tóxicos producidos por hongos y mohos se designan como micotoxinas. El principal efecto de la intoxicación aguda por micotoxinas es el deterioro de la función hepática o renal. Sin embargo, algunas micotoxinas interfieren con la síntesis de proteínas y producen efectos que van desde la sensibilidad o necrosis de la piel hasta la inmunodeficiencia extrema. Otras son neurotoxinas, que en dosis bajas pueden causar temblor sostenido, mientras que en dosis ligeramente más altas causan daño cerebral o la muerte. El efecto común crónico de muchas micotoxinas es la inducción de cáncer, especialmente del hígado. Algunas micotoxinas afectan la replicación del ADN y, por lo tanto, pueden producir efectos mutagénicos o teratogénicos (Pitt, 2000). Se sabe que al menos 14 micotoxinas son cancerígenas, donde las aflatoxinas son las más potentes (Majumdar et al., 2018).

### 2.4.1 Aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos derivados de policétidos, generalmente infectan los cultivos de cereales, incluidos trigo, maíz, algodón, cacahuates y nueces (P. Kumar et al., 2017). Estas micotoxinas se presentan en varias formas químicas, designadas como: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M<sub>1</sub>. "B" y "G" (Figura 2.1). Las letras "B" y "G" se refieren a la fluorescencia azul (Blue) o verde (Green) observada tras la exposición de la toxina a la radiación ultravioleta y el número a su posición relativa en placas de cromatografía en capa fina. M<sub>1</sub> es el metabolito hidroxilado predominante de aflatoxina B<sub>1</sub> excretado en la leche de humanos y animales lactantes que consumen alimentos o piensos contaminados con aflatoxina B<sub>1</sub> (Murphy et al., 2006).

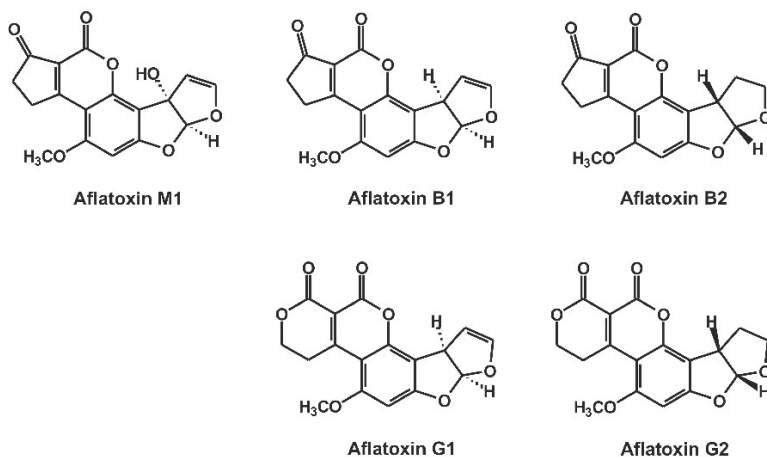


Figura 2.1. Estructura química de las principales aflatoxinas contaminantes de alimentos (Murphy et al., 2006).

Las aflatoxinas afectan principalmente el hígado y provocan hepatotoxicidad causando fiebre, malestar general y anorexia seguidos de dolor abdominal, vómitos y hepatitis. La toxicidad crónica por aflatoxinas comprende efectos inmunosupresores y carcinogénicos (P. Kumar et al., 2017)

#### 2.4.2 Ocratoxinas

Las ocratoxinas son pentacétidos derivados de la familia de las dihidrocumarinas acoplada a  $\beta$ -fenilalanina. Su nombre químico es: L-fenilalanin-N -[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonil]-(*R*) isocumarina, comprenden al menos 15 metabolitos secundarios estructuralmente similares (el Khoury & Atoui, 2010) de los cuales la ocratoxina A (OTA) es la más tóxica (Figura 2.2).

La OTA ha sido encontrada en nueces, centeno, avena, cebada, trigo, café, queso y carne de animales que consumieron granos infectados con la micotoxina (Eskola et al., 2019; Malir et al., 2016). Las principales fuentes de exposición para los humanos son: cereales, vino, jugo de uvas, café y carne de puerco con aproximadamente, 58%, 21%, 7%, 5% y 3% de la ingesta total de OTA que se podría consumir en la dieta promedio (Mbundi et al., 2014). Esta micotoxina posee resistencia a acidez y altas temperaturas por lo que su eliminación de los alimentos contaminados es difícil. El consumo de OTA puede provocar nefrotoxicidad, neurotoxicidad, inmunosupresión, genotoxicidad, carcinógenesis y teratogénesis. Ha sido clasificada como posible carcinógeno humano por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) (Sueck et al., 2020).

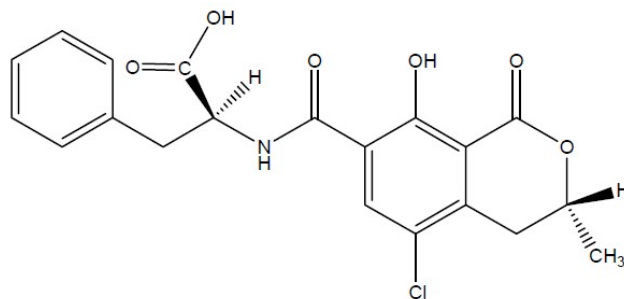


Figura 2.2. Estructura química de la OTA (Malir et al., 2016)

## 2.5 Métodos para la conservación de alimentos

Existen métodos químicos, físicos y biológicos utilizados para disminuir la tasa de deterioro de los alimentos, entre los que se encuentran la reducción del pH, la adición de ácidos u otros conservadores, la inoculación con microorganismos generalmente reconocidos como seguros (GRAS por sus siglas en inglés) antagonistas de patógenos, la adición de azúcar o cloruro de sodio, la remoción de agua, la limitación del oxígeno disponible, y la congelación (Rawat, 2015). La actividad antimicrobiana de un compuesto depende en gran medida de sus características fisicoquímicas tales como polaridad, hidrofobicidad, y volatilidad; y en relación con la diversidad y propiedades de cada alimento (contenido de grasas y proteínas, pH, actividad del agua y homogeneidad), es por ello que resulta complicado generalizar los métodos de conservación (Barberis et al., 2018).

### 2.5.1 Métodos físicos para la conservación de alimentos

El crecimiento microbiano puede inhibirse mediante procesos de deshidratación física (secado y liofilización), temperatura (alta o baja), radiación UV o ionizante, y métodos emergentes como alta presión hidrostática (APH), campos eléctricos pulsados (CEP), o la eliminación de microorganismos mediante filtración por membranas.

En el proceso de deshidratación y congelación, un parámetro importante a considerar es la disponibilidad de agua del alimento, determinada por la actividad de agua ( $a_w$ ) definida como la relación de la presión de vapor de agua en un alimento a la presión de vapor de agua

pura a la misma temperatura. La mayoría de las bacterias patógenas no pueden crecer por debajo de una actividad de agua de 0.85; mientras que la mayoría de las levaduras y mohos son más tolerantes a la actividad de agua reducida, pero por lo general no se produce crecimiento por debajo de una actividad de agua de aproximadamente 0.62 (Rahman, 2009).

En cuanto a los métodos que utilizan radiación, el rango UV de longitud de onda más destructivo para los microorganismos está entre 240 y 280 nm. Los rayos gamma de alta energía, comúnmente de Co 60 y Cs 137 (Farkas, 2007), son efectivos para matar esporas microbianas en productos alimenticios. El principio se basa en el hecho de que la radiación puede dañar los ácidos nucleicos impidiendo la duplicación celular.

Por otro lado, los CEP cargan las células de tal manera que se comportan como pequeños dipolos y se desarrolla un potencial eléctrico sobre las membranas celulares que conduce a un aumento en la permeabilidad hasta tal punto que el contenido celular se escapa y las células mueren (Farkas, 2007; Majumdar et al., 2018). Sin embargo, el uso de métodos físicos para la preservación de alimentos puede causar cambios en las propiedades organolépticas y pérdida de nutrientes.

### 2.5.2 Métodos químicos para la conservación de alimentos

Los conservadores químicos son definidos como sustancias artificiales capaces de inhibir, retardar o restringir el crecimiento microbiano o su metabolismo, en algunos casos a su vez, tienen la función de actuar como antioxidantes, saborizantes y modificadores del pH (Amit et al., 2017). Ejemplos de conservadores químicos son: benzoatos, sorbatos, nitratos, ácido propiónico, dióxidos de azufre, sulfitos, fosfato trisódico, polifosfato de sodio, clorito de sodio acidificado, agua oxidante electrolizada, ozono, peróxido de hidrógeno y cloro (Majumdar et al., 2018).

El uso de compuestos químicos conlleva a efectos nocivos para el consumidor asociados con carcinogenicidad, toxicidad, teratogenicidad y algunos de ellos impactan en el ambiente debido a que presentan periodos lentos de degradación (Barberis et al., 2018). Por ejemplo, los sulfitos pueden provocar cefalea, palpitaciones, alergias, e incluso cáncer; los nitratos y nitritos se convierten en ácido nitroso y se sospecha que causa cáncer de estómago; los benzoatos pueden provocar alergias, asma y erupciones cutáneas (Sharma, 2015).

### 2.5.3 Métodos biológicos para la conservación de alimentos

En la actualidad se demandan productos alimenticios mínimamente procesados con una amplia vida de anaquel. La bioconservación es una alternativa confiable dado que no interfiere con las características nutricionales y organolépticas de los alimentos y es amigable con el medio ambiente. Los agentes de biocontrol se pueden obtener de diferentes fuentes, incluyendo plantas (saponinas, flavonoides, carvacrol, timol, citral, eugenol, linalol y terpenos), animales (lactoferrina, lisozima, lactoperoxidasa), derivados de insectos y crustáceos (quitosano) bacterias (nisina, natamicina, ácidos orgánicos), y hongos (fenoles, ácido gálico, ácidos grasos libres y sus derivados) (Barberis et al., 2018). La bioconservación es una técnica de conservación de alimentos que utiliza el potencial antimicrobiano de los organismos naturales y sus metabolitos (Singh, 2018). Tanto la producción de biomasa microbiana benéfica como sus metabolitos antimicrobianos se da a través de procesos de fermentación (Reis et al., 2012; Singh, 2018).

Existen varios requisitos a considerar al utilizar un microorganismo como agente de biocontrol, algunas de ellas son: estabilidad genética, eficacia a bajas concentraciones y contra un amplio rango de patógenos en varios productos, requerimientos nutricionales simples, supervivencia en condiciones adversas, crecimiento en sustratos simples, organismos GRAS (Parveen et al., 2016).

Los agentes biológicos utilizados en los alimentos pueden clasificarse como cultivos iniciadores y cultivos protectores. Los cultivos iniciadores son microorganismos que inician la fermentación y ayudan en la producción de compuestos responsables de la textura y aromas en los productos fermentados. El cultivo protector se utiliza principalmente para reducir la supervivencia y el crecimiento de microorganismos patógenos en los alimentos (Singh, 2018).

### 2.6 Bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL están presentes naturalmente en diversos sistemas alimentarios, principalmente en alimentos fermentados, la mayor parte de ellas se clasifican como GRAS y han sido aprobadas como un aditivo alimentario en más de 50 países por sus propiedades

antimicrobianas y por su potencial para mejorar las propiedades organolépticas de los alimentos (Barberis et al., 2018). Se clasifican en seis familias y al menos 38 géneros dentro de los que se encuentran: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella* (Bianchini, 2015).

Las BAL se clasifican como: homofermentativas obligatorias, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligatorias (Gänzle, 2015). Las BAL que utilizan la vía homofermentativa EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) pueden convertir la mayor parte de la fuente de carbono (más del 85%), en ácido láctico cuando dicha fuente es abundante. En otro escenario si hay limitación de sustrato, el crecimiento es bajo y la ruta glucolítica lenta, bajo estas condiciones se produce formiato, acetato, etanol y lactato. Este cambio en el metabolismo está regulado por las enzimas lactato deshidrogenasa y piruvato formato liasa, controladas por la relación NADH/NAD<sup>+</sup> (Reis et al., 2012; Zaunmüller et al., 2006). Las BAL que utilizan la vía heterofermentativa (ruta 6-phosphogluconato/fosfoacetolasa), degradan hexosas y pentosas para la generación de muchos otros metabolitos (ácidos orgánicos, acetato, acetoína, etanol, dióxido de carbono, diacetil y acetaldehído) (Reis et al., 2012).

El metabolismo de las BAL en cultivo aerobio y anaerobio puede ser distinto, resultando en algunos casos beneficioso, mientras que en otros perjudicial para ser utilizadas como agentes de biocontrol. En general las BAL poseen una NADH oxidasa citoplasmática que cataliza la reducción de O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Al transferir un electrón a una molécula de O<sub>2</sub> pasa a ser ion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y dada su inestabilidad se convierte rápidamente en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En la ruta glucolítica del metabolismo de azúcares para regenerar el NAD<sup>+</sup> las BAL utilizan las enzimas deshidrogenasa láctica, acetaldehído deshidrogenasa y alcohol deshidrogenasa. Sin embargo, en presencia de O<sub>2</sub>, la enzima NADH oxidasa y NADH peroxidasa participan en el mecanismo de regeneración del NAD<sup>+</sup>, teniendo un efecto sobre la producción de piruvato, acetyl-Co A y acetaldehído, es decir, se modifica el espectro de productos finales de fermentación y como consecuencia la capacidad antimicrobiana de las BAL es afectada (Condon, 1987; Niel & Hofvendahl, 2002; Van de Guchte et al., 2002).

## 2.7 Mecanismos de control biológico

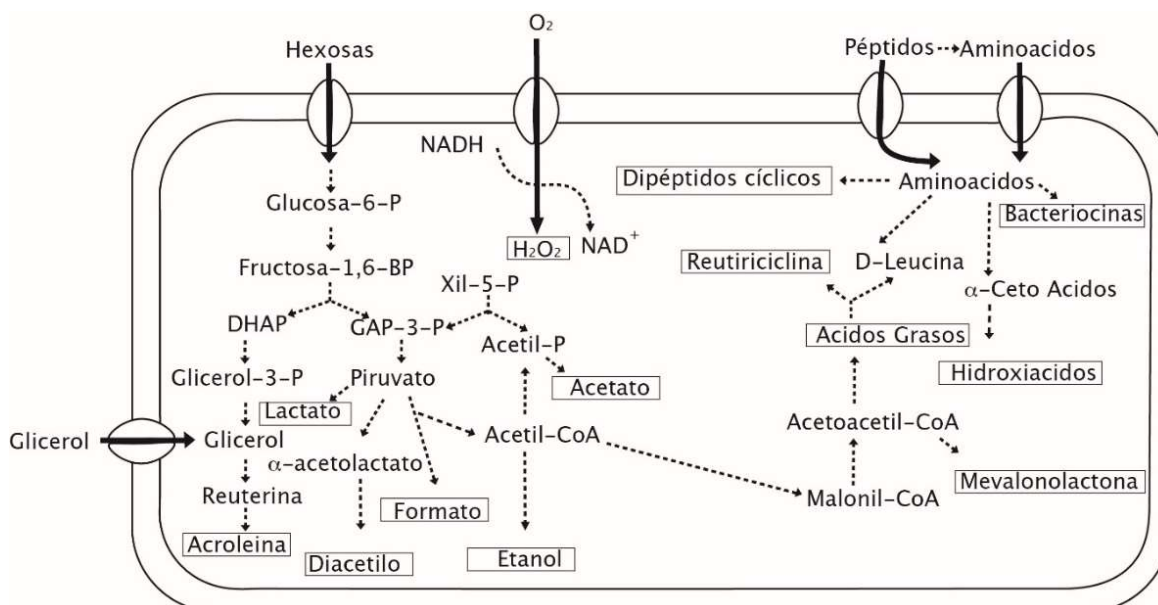


Figura 2.3. Compuestos antimicrobianos producidos durante el metabolismo de BAL. Modificación de la propuesta de: Siedler et al., 2019

El control biológico de microorganismos involucra mecanismos de competencia (espacio, minerales y nutrientes) y antibiosis (producción de enzimas, compuestos volátiles, agentes líticos, antibióticos o bacteriocinas y otras sustancias) (Shyam et al., 2020).

### 2.7.1 Competencia por nutrientes y espacio

En la competencia por nutrientes como carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y minerales, así como oxígeno, los antagonistas disminuyen la disponibilidad de nutrientes o los vuelven inaccesibles, convirtiendo por ejemplo los azúcares en una matriz de polisacáridos que posteriormente pueden utilizar exclusivamente como fuente de carbono. En el caso de la competencia por espacio, la velocidad de crecimiento del antagonista es generalmente más alta (Dukare et al., 2019).

### 2.7.2 Compuestos antifúngicos producidos por BAL

El efecto antimicrobiano de las BAL se debe a la producción de uno o más metabolitos activos (Figura 2.3), como los ácidos orgánicos (ácidos láctico, acético, fórmico, propiónico

y butírico) y otros metabolitos tales como: etanol, ácidos grasos, acetoína, peróxido de hidrógeno, diacetilo, compuestos antimicóticos (propionato, fenil-lactato, dipéptidos cíclicos y ácidos grasos 3-hidroxi), bacteriocinas (nisina, reuterina, reuteriicina, pediocina, lacticina, enterocina) (Reis et al., 2012). Las bacteriocinas serán mencionadas en una sección independiente.

La actividad antimicrobiana debida a la presencia de ácidos orgánicos depende en gran medida del pH, ya que estos compuestos sólo son activos en forma no disociada, es decir, a  $\text{pH} < \text{pKa}$ , de esta forma, su condición lipofílica les permite penetrar a través de la membrana. A un pH intracelular más alto, el ácido se disocia para liberar protones y conjugar bases, lo que altera la fuerza protón-motriz de la membrana (Cabo et al., 2002) causando disminución de la energía disponible para el crecimiento celular debido a la inhibición de absorción de compuestos (Reis et al., 2012).. El pKa de los ácidos más comunes producidos por BAL está por debajo de 5.0. Por ejemplo, el pKa del ácido láctico, acético, y propiónico es de: 3.8, 4.7, y 4.9, respectivamente (De Muynck et al., 2004).

El efecto antimicrobiano del peróxido de hidrógeno se ha atribuido a la peroxidación de los lípidos de la membrana lo que produce un aumento en su permeabilidad y la destrucción de estructuras proteicas. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también puede ser un precursor para la producción de radicales libres como superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) e hidroxilo (OH) que pueden dañar los ácidos nucleicos (Özogul & Hamed, 2018).

También denominados 2,5-dicetopiperazinas (Figura 2.4). Los dipéptidos cíclicos son metabolitos producidos a través de una vía no ribosómica que utiliza una enzima multifuncional. Estos metabolitos presentan actividad antitumoral, antiviral, antimicrobiana y antihiper glucémica y además se cree que están relacionados con la comunicación celular entre microorganismos (P. de Carvalho & Abraham, 2012). Se ha reportado que los derivados deshidrogenados de los dipéptidos cíclicos causan inhibición de la división celular (Martins & Carvalho, 2007).



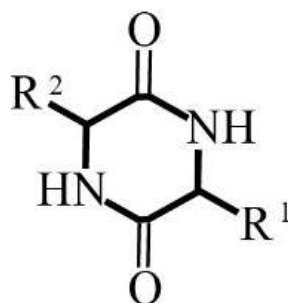


Figura 2.4. Estructura química general de las 2, 5-diketopiperazinas. R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son los radicales de las cadenas laterales de las variaciones de las distintas ocratoxinas (P. de Carvalho & Abraham, 2012).

### 2.7.3 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados por ribosomas, generalmente tienen bajo peso molecular y sufren modificaciones postraduccionales. Las bacteriocinas pueden degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas, especialmente por las proteasas del tracto gastrointestinal de los mamíferos, lo que las hace seguras para el consumo humano. Considerando sus características (estructura química, tamaño molecular, estabilidad térmica) se han clasificado en tres clases: (Reginensi et al., 2016).

**Clase I.** Son bacteriocinas conocidas como lantibióticos (<5 kDa) que contienen aminoácidos de tioéter policíclicos como lantionina o metillantionina, así como los aminoácidos insaturados dehidroalanina y 2-aminoisobutírico. Siendo la nisina y la lacticina 3147 los principales representantes de este grupo (Reginensi et al., 2016).

Nisina. La nisina es un péptido de 34 aminoácidos (Figura 2.5) producida por *Lactococcus lactis* que contiene cuatro metil-lantionina, una estructura cíclica de lantionina, deshidroalanina (Dha) y dos residuos de deshidrobutirina. Se han identificado dos variantes naturales, nisina A y nisina Z que difieren por el intercambio de un solo aminoácido en la posición 27 (His (A) → Asn (Z)). La nisina es muy eficaz que ya puede inhibir las células diana (microorganismos patógenos) en el rango nanomolar, lo que se logra mediante la combinación de su alta afinidad por lípidos en la membrana y su posterior formación de poros (transitorios) dando como resultado disrupción de la membrana, liberación de material intracelular y disipación de gradientes de energía. Además, un estudio muestra que puede

bloquear el crecimiento de las células mediante la inhibición de la biosíntesis de peptidoglucano (Kleerebezem & Quadri, 2001).

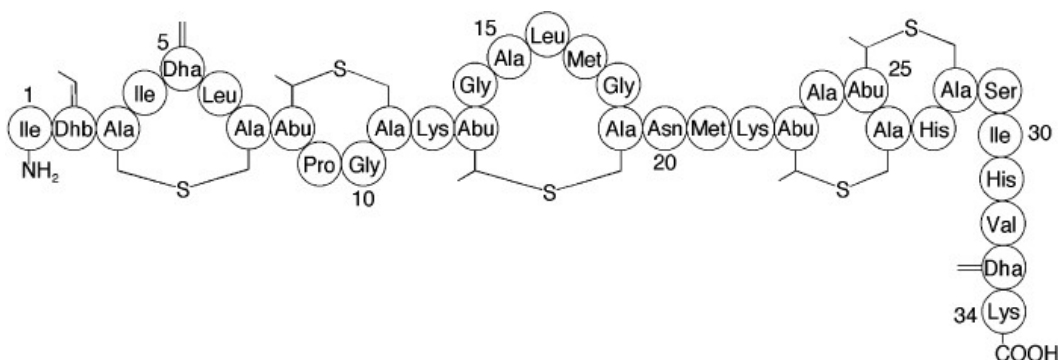


Figura 2.5. Estructura peptídica del lantibiótico nisina. Obtenido de: (Kleerebezem & Quadri, 2001)

**Clase II.** Son péptidos relativamente termoestables (< 10 kDa) agrupados en 3 subclases, la primera presenta la secuencia concensus Tyr-Gly-Asn-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys, la segunda subclase requiere la presencia de dos péptidos para ejercer su efecto antimicrobiano y la tercera presenta una estructura cíclica entre el C y N terminal (Reginensi et al., 2016).

Pediocina A1. Pertenece a la clase II de las bacteriocinas y es producida por *Pediococcus acidilactici*, en su forma activa consta de 44 aminoácidos, este péptido es de carácter no polar debido a la abundancia de residuos de aminoácidos no polares (Figura 2.6). Su peso molecular calculado a partir de la secuencia de aminoácidos es de 4628 o 4624 Da, en ausencia o presencia de dos enlaces disulfuro, respectivamente. Esta bacteriocina inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes* en productos cárnicos (Rodríguez et al., 2002).

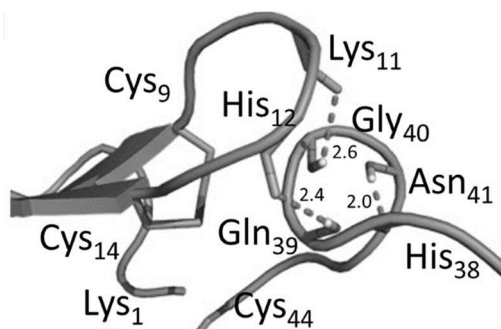


Figura 2.6. Estructura peptídica de la pediocina A1

**Clase III.** Son bacteriocinas cuyo tamaño es mayor a 30kDa, son termolábiles y tolerantes a un amplio rango de pH. Se ha reportado que promueven lisis de la pared celular, la parte C terminal es responsable del reconocimiento de la célula objetivo y la parte N terminal tiene actividad endopeptidasa (Reginensi et al., 2016).

Lisostafina. Es una bacteriocina producida por *Staphylococcus aureus* de la clase III, es una metaloenzima monomérica de 246 aminoácidos que contiene zinc (Figura 2.7). Tiene una masa molecular de ~27 kDa. Su capacidad antimicrobiana se debe a su actividad lítica de la pared celular (Freire et al., 2010).

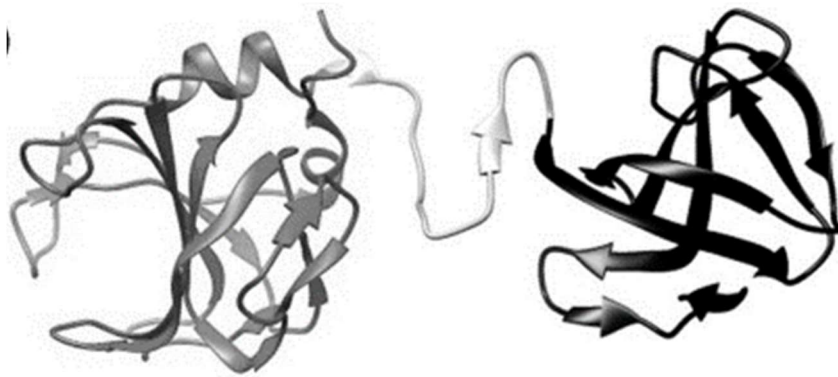


Figura 2.7. Estructura peptídica de la Lisostafina

### 3. Justificación

La contaminación de alimentos es un problema mundial, genera pérdidas económicas y representa un riesgo de salud para la humanidad. Dentro de los alimentos de consumo humano de mayor importancia desde el punto de vista de comercialización está el café, este producto es susceptible de contaminación por hongos principalmente del género *Aspergillus*, y como producto de su metabolismo secundario se encuentran las micotoxinas, compuestos orgánicos a los que se les relaciona con múltiples problemas de salud.

Dado que el uso de los métodos físicos y químicos presentan desventajas como cambios en las propiedades organolépticas de los alimentos o ejerciendo efectos secundarios en los consumidores, en la actualidad se están empleando en mayor medida los métodos de control biológico para controlar los hongos productores de micotoxinas, que incluyen el uso de microorganismos inocuos. El control biológico con microorganismos GRAS es una alternativa amigable con el medio ambiente para controlar microorganismos productores de micotoxinas en alimentos. El uso de bacterias ácido lácticas en alimentos de consumo humano ha sido ampliamente reportado, por su efecto antagónico contra diversos microorganismos patógenos.

Las bacterias ácido lácticas presentan diversos mecanismos de acción para evitar el desarrollo de microorganismos productores de micotoxinas, tanto por contacto físico, así como por la producción de diversos metabolitos que de manera sinérgica evitan su desarrollo.

Conforme a lo anterior expuesto, en este trabajo se plantea el uso de bacterias ácido lácticas para evitar el crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162, así como la producción de OTA. En este trabajo se evaluó el efecto de la modificación del medio de cultivo de Man Rogosa y Sharpe (MRS) variando la concentración de factores nutricionales (cloruro de calcio, cloruro de sodio, extracto de levadura y citrato de amonio) y la adición de polioles, con el fin de aumentar la producción de metabolitos con actividad antifúngica.

## 4. Hipótesis

La adición de cloruro de calcio, cloruro de sodio, extracto de levadura, citrato de amonio y polioles al medio de cultivo MRS inducirá la producción de compuestos antifúngicos por bacterias ácido lácticas mejorando la actividad antifúngica contra *A. carbonarius*.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo General

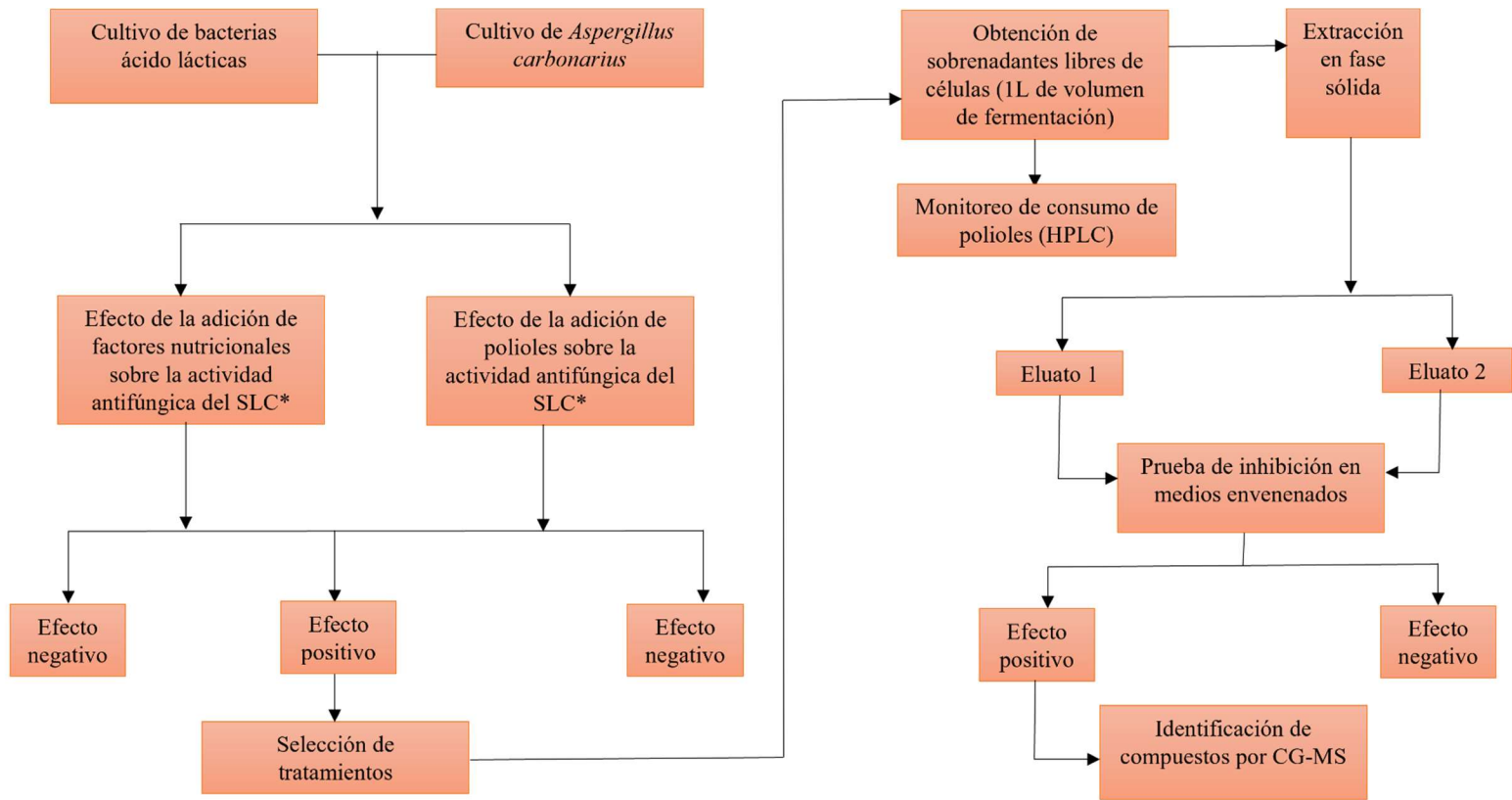
Inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* y la producción de Ocratoxina A mediante el uso del sobrenadante libre de células del cultivo de bacterias ácido lácticas de Costa de Marfil y de México.

### 5.2 Objetivos específicos

- Evaluar el efecto del pH sobre la actividad antifúngica del sobrenadante libre de células del cultivo de bacterias ácido lácticas.
- Comparar la actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas al adicionar sales y variar la concentración de extracto de levadura del medio de cultivo.
- Determinar el efecto de la presencia de polioles en la actividad antifúngica de las bacterias ácido lácticas.
- Extraer e identificar compuestos con actividad antifúngica producidas por bacterias ácido lácticas.

## 6. Estrategia de trabajo

La figura 6.1 muestra la estrategia experimental para los ensayos realizados en las secciones siguientes. En primer lugar, se estudió el efecto de inhibición del crecimiento de hongos micotogénicos, mediante el uso del SLC de los cultivos de bacterias ácido lácticas con la adición de factores nutricionales y polioles al medio de cultivo MRS. A partir de los resultados obtenidos, se seleccionaron los tratamientos con mayor actividad antifúngica para realizar la extracción e identificación de metabolitos con antifúngicos. La principal variable estudiada fue el porcentaje de inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89.



\*Sobrenadante libre de células

Figura 6.1 Estrategia experimental

## **7. Análisis del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162 y del efecto del pH, O<sub>2</sub> y duración de cultivo sobre la actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas.**

### 7.1 Resumen

En este capítulo se realizó un análisis del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162 en medio superficial. Fueron identificados los principales ácidos orgánicos producidos y se evaluó el efecto de la presencia de O<sub>2</sub> durante el cultivo de BAL, así como el efecto del pH sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células (SLC).

Se encontró que la fase de adaptación (lag) de *A. carbonarius* Ac. 162 tuvo una duración de 20 h, la fase exponencial ocurrió entre las 30 y 60 h de cultivo, y después de ese periodo comenzó su fase estacionaria de crecimiento. A partir de este resultado se propuso realizar las pruebas de inhibición entre las 48 y 72 h de cultivo.

Se estudiaron 4 cepas de BAL (J, 2, 31 y 34) de Costa de Marfil, BAL homofermentativas ya que producen principalmente ácido láctico, con bajas concentraciones de ácido propiónico y la BAL 31 también se detectó ácido butírico.

La mayor actividad antifúngica de las BAL se obtuvo entre las 72 y 96 h de cultivo bajo condiciones anaerobias. Además, se observó una disminución en la actividad antifúngica cuando el sobrenadante libre de células (SLC) fue ajustado a pH 5, no se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $\alpha \leq 0.05$ ) con valores de pH de 4.5, 6 y 7 para las BAL J, 2 y 34. En el caso de la BAL 31 se encontró un mayor porcentaje de inhibición cuando el pH es ajustado a 7 ( $65 \pm 2.6\%$ ).

A partir de las pruebas realizadas con diferentes tiempos de cultivo se encontró que los extractos libres de células del cultivo de la BAL 31 presentaron la mejor respuesta inhibitoria ya que alcanzaron un valor de  $53.8 \pm 1.6\%$  después ser cultivada 96 h en condiciones de anaerobiosis. Por lo cual esta cepa fue seleccionada para posteriores estudios.

### 7.2 Introducción: Antecedentes directos



Djossou et al (2011) investigaron en Costa de Marfil los hongos que se desarrollaron durante los tratamientos postcosecha por vía seca en las cerezas de café (*Coffea canephora* variedad robusta), de donde aislaron 218 cepas, de los cuales *Aspergillus* fue el género más representativo (65%). A su vez, identificaron las micotoxinas producidas en las muestras de café donde se encontraron aflatoxinas y en mayor medida ocratoxina A (OTA), donde *Aspergillus carbonarius* fue el mayor productor de OTA (4-56.4 µg de OTA/g de agar).

Por otro lado, los mismos autores aislaron 44 BAL de la pulpa de café ensilada identificadas como *Lactobacillus plantarum*. Probaron la actividad antifúngica de las BAL aisladas, contra *A. carbonarius* Ac. 162 (40.5 µg OTA/ g agar) y *A. carbonarius* Ac. 164 (27.6 µg OTA/ g de agar). Solo dos cepas (LabCP15Z42 y LabCP37Z12) mostraron una inhibición reproducible contra *A. carbonarius* Ac 162, mientras que la cepa LabCP15Z42 solo presentó actividad antifúngica reproducible contra *A. carbonarius* Ac 164.

Amador Hernández (2019) determinó las interacciones fisicoquímicas y ecológicas implicadas en el biocontrol de *A. carbonarius* Ac. 162 con BAL, y reportó que *Lactobacillus plantarum* MZ809351 fue capaz de inhibir el crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 en medio sólido (> 50%), mientras que en medio líquido observó actividad inhibitoria a nivel de la germinación de esporas. Además, encontró que al utilizar trehalosa en el cultivo de *Lactobacillus plantarum* MZ809351, se produjeron compuestos con actividad antifúngica como ácido láctico, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico y etanol. Con respecto a la exploración de la superficie de esporas fúngicas utilizando microscopia electrónica de barrido (MEB) se observó adhesión de las BAL en la superficie y posible daño debido a la aparición de poros en la superficie de las esporas ( $140 \pm 22.3$  nm), que podrían estar relacionados con la presencia de la bacteria en la superficie de la espora. Por último, en su trabajo se analizaron los mecanismos responsables de adhesión superficial de BAL sobre esporas fúngicas mediante microscopia de barrido laser confocal (CLSM) y espectrometría infrarroja de transformada de Fourier (FTIR), como resultado se demostró la presencia enlaces químicos superficiales pertenecientes a proteínas y polisacáridos participes como posibles biomoléculas membranales implicadas en la adhesión de *L. plantarum* sobre esporas de *A. carbonarius* Ac. 162.

Gutiérrez Rodríguez (2019) aisló e identificó microorganismos de cerezas de café en Tlacotalpa, Tabasco, realizó un análisis metagenómico de las comunidades bacterianas y fúngicas mediante secuenciación de la región 16S (bacterias) y de la región ITS2 (hongos), del cual observó la presencia de *Klebsiella* y *P. agglomerans* entre las bacterias con mayor abundancia, y la contaminación con *A. niger* en cerezas secas. Entre las unidades taxonómicas operacionales (OTUs) bacterianas los phyla *Firmicutes* se encontraron en una proporción más alta en cerezas secas, mientras que en cerezas frescas predominó el género *Weissella*. En cuanto a las OTUs fúngicas, los phyla *Ascomycota* y *Basidiomycota* fueron los dominantes, con mayor proporción de *Basidiomycota* en cerezas frescas. Así mismo, se llevó a cabo el aislamiento de bacterias y hongos filamentosos para su identificación molecular de las regiones ITS (hongos) y 16S (bacterias). Se determinó en cerezas secas abundancia de bacterias Gram-negativas, entre las que se identificó al género *Klebsiella* y *Pantoea agglomerans* y la presencia *Aspergillus niger* productor de OTA ( $105.03 \pm 16.36 \mu\text{g/kg}$  de medio).

Domínguez Gutiérrez (2019) diseñó un medio de cultivo de bajo costo para *Lactobacillus plantarum* sustituyendo las fuentes costosas de nitrógeno como el extracto de carne (EC) y la peptona de carne (PC) del medio de cultivo MRS por fuentes de nitrógeno económicas (harina de trigo, harina de soya, lenteja, cacahuete, levadura de pan, aislado de suero de leche, extracto de germen de maíz y extracto de germen de cebada). Se determinó que al utilizar extracto de germen de malta (EGM) se alcanzaron concentraciones celulares cercanas a las obtenidas con el medio de referencia MRS ( $3 \times 10^9$  UFC/mL).

Aguilar et al., (2021) analizaron muestras de café de Chiapas en el ciclo 2017/2018. La concentración promedio de OTA en 97 de las muestras analizadas fue de  $0.41 \mu\text{g/kg}$ . No se detectó OTA en el 52% de las muestras; en el 45% de las muestras, la concentración osciló entre  $0.05$  y  $3.4 \mu\text{g/kg}$ , por debajo del límite de la normativa europea ( $<5 \mu\text{g/kg}$ ), y en solo el 3% de las muestras los valores de OTA superaron la normativa europea.

### 7.3 Materiales y métodos

### 7.3.1 Microorganismos

Para el desarrollo de este proyecto se utilizó *A. carbonarius* Ac. 162 productor de OTA aislado en Costa de Marfil a partir de muestras de cerezas de café secadas al natural (Djossou et al., 2011). La cepa fue conservada en viales crioprotectores con medio Czapek con extracto de levadura (CYA) (Tablas A1 y A2) y glicerol (50% v:v) a -20°C. Para realizar los cultivos, se tomaron alícuotas de 50 µL de los viales crioprotectores y se inocularon matraces con 30 mL de medio PDA estéril (BD Bioxon, Querétaro, México) y se llevaron a incubación a 30 °C durante 7 días.

En cuanto a los microorganismos empleados para realizar el control biológico se utilizaron BAL provenientes del ensilado de pulpa de café en Costa de Marfil (Djossou et al., 2011) identificadas como *Lactobacillus plantarum* J, 2, 31 y 34. Las cepas fueron conservadas en viales con medio crioprotector (medio MRS:glicerol (50%, v:v) conservadas a -20 °C). Para los experimentos se tomaron alícuotas de 50 µL de los viales crioprotectores para inocular tubos con 9.5 mL de medio MRS estéril (Difco™, Sparks, USA) y se incubaron a 30 °C durante 24 h.

La actividad antifúngica fue evaluada mediante la técnica de cultivos envenenados (Balouiri et al., 2016) de los SLC de BAL después de 48, 72 y 96 h de cultivo en medio MRS a 30 °C bajo condiciones anaerobias. De igual manera se determinó la actividad antifúngica al variar el pH a valores de 4.5, 5, 6 y 7 con ácido clorhídrico 0.1 M e hidróxido de sodio 0.1 M con el fin de neutralizar la actividad antifúngica debida a la presencia de ácidos orgánicos. Finalmente se determinó el efecto de la presencia de O<sub>2</sub> sobre la actividad antifúngica de los SLC de las BAL de Costa de Marfil.

La actividad antifúngica fue determinada midiendo los halos de crecimiento con un vernier a las 72 h de cultivo en cajas Petri.

### 7.3.2 Activación y resiembra de *A. carbonarius* Ac. 162

Para la activación de *A. carbonarius* Ac. 162 se colocaron 50 µL del stock de la suspensión de esporas en matraces con 30 mL de medio PDA y se incubaron durante 7 días a 30 °C; transcurrido este periodo de tiempo se agregaron 20 mL de solución estéril de Tween

80 (0.1% v/v) al cultivo activado para suspender las esporas con la ayuda de un agitador magnético estéril con agitación suave durante 5 min. A partir de esta suspensión se tomaron 500  $\mu$ L y se adicionaron a 30 mL de medio PDA, se incubaron durante 7 días a 30 °C. Posteriormente, se preparó la suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL con tween 80 (0.1 % v/v), el conteo se realizó con cámara de Neubauer.

### 7.3.3 Cultivo de bacterias lácticas

Las BAL se activaron empleando 50  $\mu$ L del stock conservado a -20 °C (sección 6.3.1), en 9 mL de medio MRS estéril y se incubó durante 24 h a 30 °C. A partir de este cultivo se realizó una segunda activación con 1 mL de este cultivo adicionados a 9 mL de medio MRS estéril, las condiciones de activación fueron las mismas que se utilizaron en el cultivo anterior. Se llevó a cabo una resiembra en botellas serológicas de 60 mL con 4 mL del cultivo anterior en 36 mL de medio MRS estéril y se incubaron a 30 °C por 48, 72 y 96 h. Para cultivos aerobios las botellas fueron cerradas con tapón de algodón estéril, mientras para generar la atmosfera anaerobia a las botellas herméticamente cerradas se hizo circular una corriente de N<sub>2</sub> para desplazar el aire del medio. Al final de los tiempos de fermentación, los cultivos se centrifugaron a 8500 rpm durante 15 min a 10 °C y el sobrenadante se filtró con una membrana estéril (Nucleopore, Costar) de 0.45- $\mu$ m de tamaño de poro, los SLC se refrigeraron a 4 °C hasta su uso.

### 7.3.4 Determinación de la inhibición del crecimiento fúngico en medios envenenados

Se prepararon cajas Petri de 90 mm de diámetro con 20 mL de una mezcla de medio PDA (agar 2x) y SLC (50:50 v/v) por triplicado. En el centro de las cajas se hicieron pozos de 8 mm de diámetro donde se inocularon 100  $\mu$ L de suspensión de esporas de *A. carbonarius* Ac. 162 ( $1 \times 10^6$  esporas/mL). Posteriormente se midió cada 24 h el halo de crecimiento del hongo con un vernier.

### 7.3.5 Prueba preliminar de crecimiento de *A. carbonarius* Ac 162

Con el fin de conocer la cinética de crecimiento de *A. carbonarius* Ac 162 para determinar el tiempo de cultivo de las pruebas de inhibición se monitoreó el crecimiento del hongo por respirometría colocando 30 g de perlas de poliacrilamida previamente hidratadas con medio Czapek-Levadura (CYA), fueron empacadas en columnas de vidrio estériles donde se inocularon 100 µL de una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL (sección 6.3.1). Las columnas se incubaron a 30 °C con un suministro de aire por la parte inferior de la columna a un flujo de 25 mL/min. El tiempo de incubación fue de 4 días. La producción de CO<sub>2</sub> se modeló utilizando la ecuación logística 6.1:

$$\frac{dCO_2}{dt} = \mu_{CO_2} CO_2 \left( 1 - \frac{CO_2}{CO_{2max}} \right) \quad \text{Ecuación 6.1}$$

### 7.3.6 Producción de ácidos orgánicos

La producción de ácidos orgánicos fue determinada por duplicado con un método isocrático (Diano et al., 2007) en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipado con una bomba LC-20, un detector de índice de refracción RID-20<sup>a</sup>, una columna Aminex HPX 87H. Como fase móvil se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 mM a un flujo de 600 µL/min y una temperatura de 60 °C.

### 7.3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como media ± intervalo de confianza (ecuación 6.2). Se realizó un ANOVA de los datos y las medias se compararon usando la prueba de Tukey ( $\alpha \leq 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó usando el paquete estadístico PASW Statistics 18.

$$\text{Intervalo de confianza} = \bar{x} \pm 1.96 \left( \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \right) \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Donde  $\bar{x}$  es la media,  $\sigma$  la desviación estándar y  $n$  el tamaño de la muestra

## 7.4 Resultados y discusión

### 7.4.1 Parámetros cinéticos del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162

La Figura 7.1 muestra la tasa de producción de CO<sub>2</sub> de *A. carbonarius* Ac. 162 en las condiciones descritas en la sección 7.3.4. Se obtuvo una tasa máxima de producción de CO<sub>2</sub> de 0.43 mg de CO<sub>2</sub> /h·g medio a las 40 h de cultivo. Se encontró que la fase de adaptación (lag) de *A. carbonarius* Ac. 162 tuvo una duración de 20 h, la fase exponencial entre las 30 y 60 h de cultivo; a partir de este último tiempo de fermentación comenzó su fase estacionaria de crecimiento (Figura 6.2). La producción total observada de CO<sub>2</sub> fue de 7.6 mg CO<sub>2</sub>/g PAA. Los parámetros de crecimiento calculados con el modelo logístico ( $R^2 = 0.99$ ) arrojaron un valor de CO<sub>2max</sub> de 7.2 mg CO<sub>2</sub>/gPAA, valor cercano al obtenido experimentalmente. La constante específica de producción de CO<sub>2</sub> ( $\mu_{CO_2}$ ) tuvo un valor de 0.16 h<sup>-1</sup>. A partir de estos resultados se decidió tomar como tiempo final de fermentación 3 días (72 h) de cultivo para realizar las pruebas de inhibición dado que la actividad microbiana después de este periodo es despreciable.

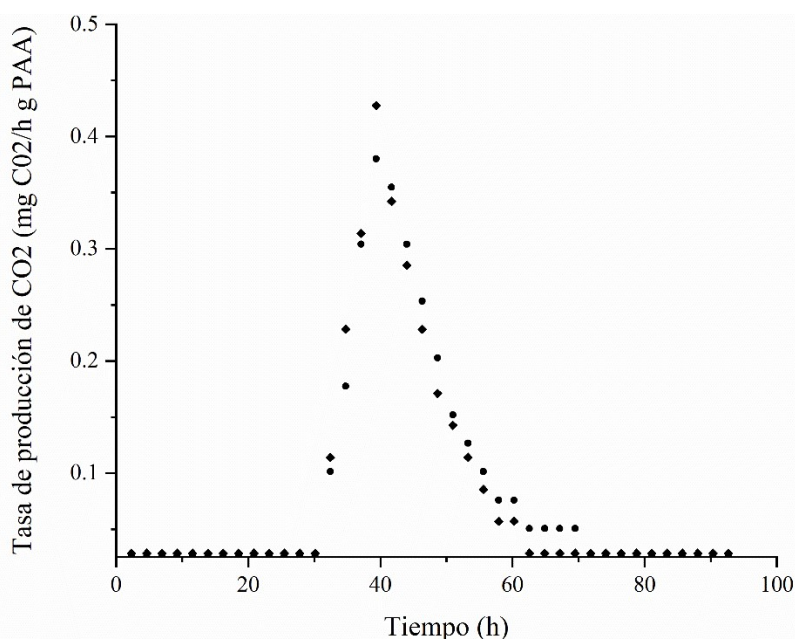


Figura 7.1. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> de *A. carbonarius* durante el crecimiento en columnas empacadas con perlas de poliacrilamida hidratadas con medio Czapek con extracto de levadura.

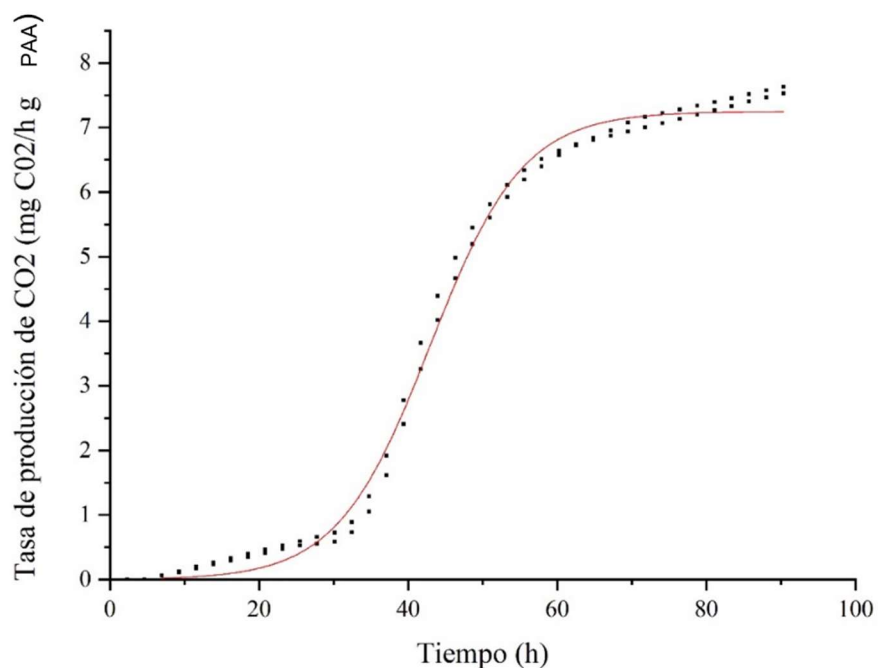


Figura 7.2. Tasa de producción de CO<sub>2</sub> durante el crecimiento en columnas empacadas con perlas de poliacrilamida hidratadas con medio Czapek con extracto de levadura de *A. carbonarius* Ac. 162. Los cuadros representan los valores experimentales y la línea continua el ajuste al modelo

Los resultados de la producción de CO<sub>2</sub>, proporcionan información de la actividad metabólica del hongo. En este caso se observó que a partir de las 48 h aproximadamente se da un decaimiento del crecimiento somático y comienza a presentarse la esporulación (Figura 7.3). Aunado a lo anterior posterior a las 72 h se tiene una producción de CO<sub>2</sub> mínima, lo que es señal de que el crecimiento somático está por concluir y prevalece la esporulación, por lo tanto, se establecieron tiempos entre 48 y 72 h para realizar la prueba de inhibición.

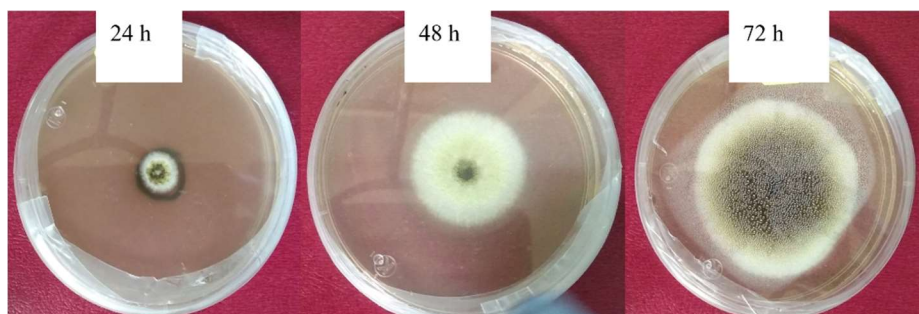


Figura 7.3 Crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* Ac. 162 en medio Czapek con extracto de levadura durante 72 h a 30 °C

#### 7.4.2 Efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad antifúngica del SLC de las BAL.

El tiempo de incubación es un factor que modula la cantidad de metabolitos con actividad antifúngica. Durante el crecimiento microbiano, se producen diversos metabolitos. Por una parte, tenemos aquellos que corresponden al metabolismo primario y son el producto directo de las reacciones esenciales para el crecimiento y la vida. Por otro lado, existen otros compuestos que son biosintetizados a partir de compuestos del metabolismo primario y que aparentemente no tienen una función en el crecimiento pero que juegan un papel en la interacción con el entorno, y son considerados producto del metabolismo secundario (Hodgson, 2000; Verpoorte R., 2000). Los metabolitos con actividad antifúngica producidos por BAL generalmente son producidos al terminar la fase exponencial de crecimiento (Zhao et al., 2017), es decir, durante la fase estacionaria asociada al metabolismo secundario. Por ejemplo, estudios previos mostraron que *Lactobacillus plantarum* CUK501 y *Lactobacillus acidophilus* tuvieron su máxima actividad antifúngica a las 48 horas de cultivo (Bianchini, 2015) mientras que en otras investigaciones ha sido reportado que *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis* produce la mayor cantidad de compuestos antifúngicos entre los tres y cuatro días de cultivo (Dalié et al., 2010).

Los SLC de las cuatro BAL de Costa de Marfil produjeron una mayor actividad antifúngica después de las 72 h de cultivo (Figura 7.4) lo que sugiere que se produce una mayor cantidad de metabolitos con actividad antifúngica durante la fase estacionaria de crecimiento, posiblemente como se ha reportado en la literatura son producidos como parte del metabolismo secundario (Bianchini & Bullerman, 2014; Hodgson, 2000; Verpoorte R., 2000).

La Figura 7.4 muestra la variación de la inhibición (%) del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 a los diferentes tiempos de cultivo (48, 72 y 96 h) de las 4 BAL de Costa de Marfil. Como puede observarse los SLC de las BAL J y 34 presentan los menores valores de inhibición ( $25.3 \pm 3.4$  y  $27.3 \pm 7.2$  %, respectivamente) con la mayor inhibición a las 96 h de cultivo. El SLC de la BAL 2 presentó una mayor actividad antifúngica a las 72 h de cultivo ( $41.6 \pm 5.4$  %) para posteriormente disminuir. Probablemente los compuestos con actividad antifúngica fueron consumidos por las BAL o reaccionaron con algún otro componente del



SLC (Batish et al., 1990). Por último, el SLC de la BAL 31 mostró la mejor respuesta inhibitoria alcanzado un valor de  $53.8 \pm 1.6$  a las 96 h de cultivo, sin diferencia significativa con respecto al valor obtenido a las 72 h ( $P < 0.001$ ).

A partir de los resultados anteriores se determinó la duración del cultivo de las BAL (96 h) para realizar los experimentos posteriores.

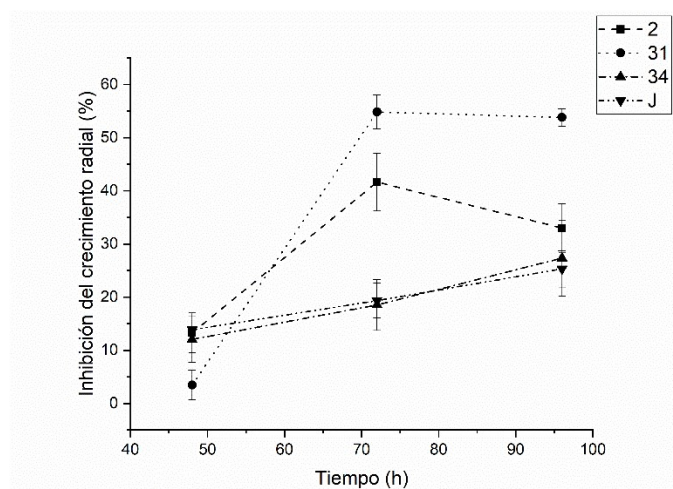


Figura 7.4. Efecto del tiempo de cultivo sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células de bacterias ácido lácticas de Costa de Marfil

### 7.4.3 Perfiles de producción de ácidos orgánicos

Los cultivos de las BAL en medio MRS durante 96 h a 30 °C tuvieron un comportamiento homofermentativo dado que como principal producto de fermentación se obtuvo ácido láctico (Figura 6.4) a una concentración de  $19.8 \pm 1.3$  g/L. En las 4 cepas se observaron trazas de etanol sugiriendo una baja actividad fosfoetolasa (Posthuma et al., 2002) y también se produjo ácido propiónico en bajas proporciones. En el caso de la cepa 31 además de los ácidos orgánicos mencionados se produjo ácido butírico, este ácido junto el propiónico pueden ser producidos por BAL mediante descarboxilación de 2-oxoácidos y desaminación de aminoácidos (Corsetti et al., 1998). A partir de la diversidad de ácidos orgánicos encontrados en la cepa 31 se explica parte del resultado obtenido en la Figura 6.3, donde esta cepa mostró mayor actividad antifúngica respecto a las demás BAL. El ácido acético no fue considerado debido a que el análisis del medio de cultivo MRS por HPLC da

una señal con un área bajo la curva similar a la obtenida en los cromatogramas del ácido acético.

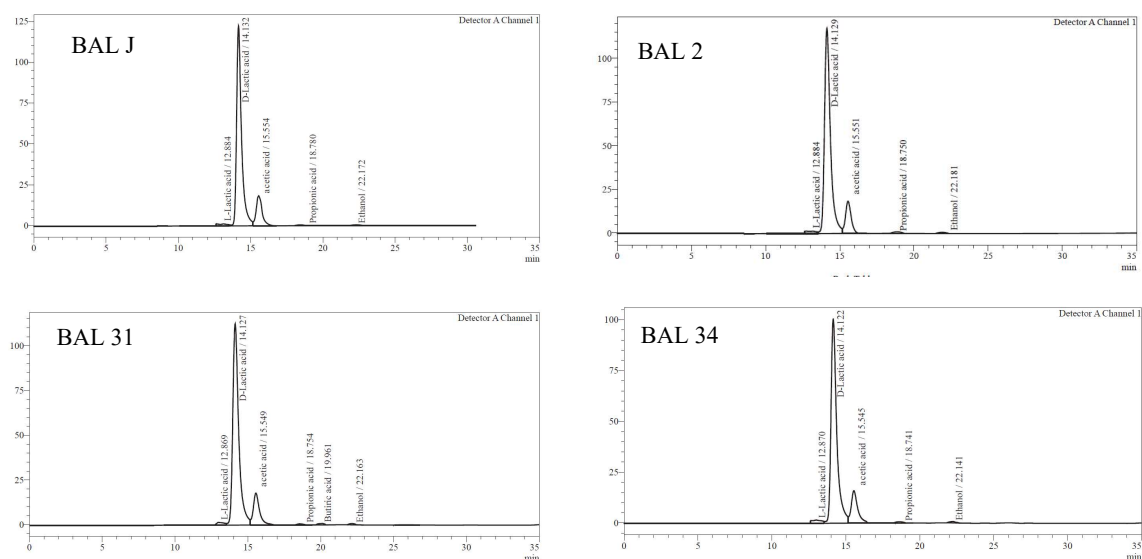


Figura 7.5. Producción de ácidos orgánicos por bacterias ácido lácticas, cultivadas en medio de Man Rogosa y Sharpe durante 96 h a 30 °C.

#### 7.4.4 Comparación del efecto antifúngico de los sobrenadantes de las BAL producidos en condiciones aerobias y anaerobias

El cultivo de las BAL bajo condiciones aerobias y anaerobias mostró dos tipos de comportamientos (Figura 7.6). Por un lado, las BAL 2 y J no tuvieron diferencias significativas en cultivo aerobio o anaerobio y alcanzaron una inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162 de  $42.2 \pm 2.1$  % y  $41.5 \pm 4.9$  %, respectivamente. Por otro lado, las BAL 31 y 34 si presentaron diferencias significativas en la inhibición de *A. carbonarius* Ac. 162; se observó una mejor respuesta cuando estas BAL fueron cultivadas en ausencia de O<sub>2</sub>. Con la BAL 34 se obtuvo  $39.5 \pm 1.8$  % de inhibición, mientras que con la BAL 31 se alcanzó una inhibición de  $52.2 \pm 2.3$ %. Este último tratamiento fue estadísticamente diferente a los demás tratamientos ( $P < 0.05$ ). Conforme a estos resultados se tomó la decisión de cultivar las BAL para experimentos posteriores en cámaras de anaerobiosis dado que la presencia de O<sub>2</sub> podría estar generando estrés oxidativo y afectando de manera negativa la producción de metabolitos antifúngicos (Van de Guchte et al., 2002). O bien, en presencia de O<sub>2</sub>, la enzima NADH oxidasa y NADH peroxidasa tuvieron un efecto negativo sobre la producción de

metabolitos con actividad antifúngica (Condon, 1987; Niel & Hofvendahl, 2002; Van de Guchte et al., 2002).

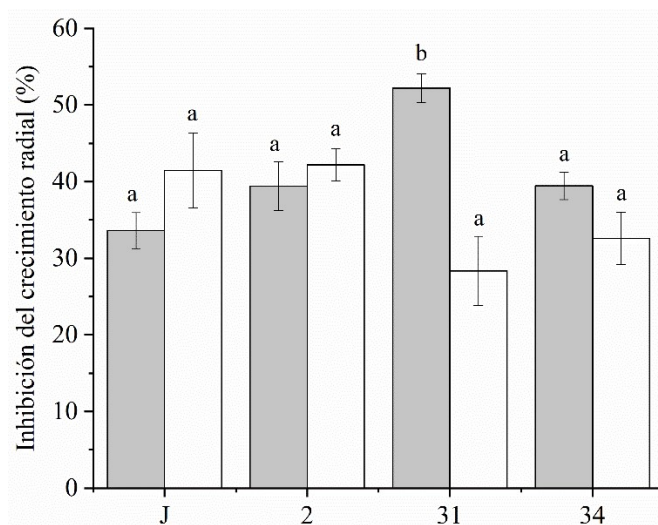


Figura 7.6. Efecto de la presencia de O<sub>2</sub> en el cultivo de BAL de Costa de Marfil sobre la actividad antifúngica de *A. carbonarius* Ac. 162. Las barras grises corresponden a condiciones anaerobias y las barras blancas a los cultivos aerobios.

#### 7.4.5 Efecto del pH sobre la actividad antifúngica de los SLC de las BAL

La actividad antifúngica de un microorganismo puede aumentarse siguiendo varias estrategias, por ejemplo, el efecto antimicrobiano de los ácidos orgánicos es influenciado por el pH del medio, debido a que su forma no disociada puede ser entre 10-600 veces más fuerte que su forma disociada. El pH del medio puede reducirse por varios factores incluidos los tipos y concentraciones de bacterias y carbohidratos fermentables, la tasa de crecimiento, producción de metabolitos, la presencia de factores de inhibición, así como el pH inicial y la capacidad amortiguadora del medio (Helander & Wright, 2004).

El ajuste del pH de los SLC tuvo efecto sobre la inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162. A pH 4.5 los ácidos propiónico y acético se encuentran en su forma no disociada y pueden ejercer su actividad antifúngica; al aumentar el valor de pH a 5, estos ácidos se disocian y pierden su actividad antifúngica. Este comportamiento se observó en la inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162, a los valores de pH en donde los ácidos propiónico y acético no estaban disociados, hubo mayor inhibición, mientras que a valores

donde estos ácidos estaban disociados, el porcentaje de inhibición disminuyó (Figura 6.6). Entre los valores de pH 6 y 7 no se obtuvo diferencia significativa en el porcentaje de inhibición, sin embargo, hubo un aumento significativo respecto del obtenido con pH 5, este resultado sugiere que no solo los ácidos orgánicos son los responsables de la actividad antifúngica, tal es el caso de algunos lipopéptidos que son bioactivos a pH neutro, mientras que a valores ácidos pierden su actividad (Makovitzki & Shai, 2005; Satpute et al., 2016). En estos resultados no se consideró al ácido láctico dado que a pH 4.5 se encuentra por encima de su valor de pKa (3.8) y por lo tanto su actividad antifúngica fue neutralizada.

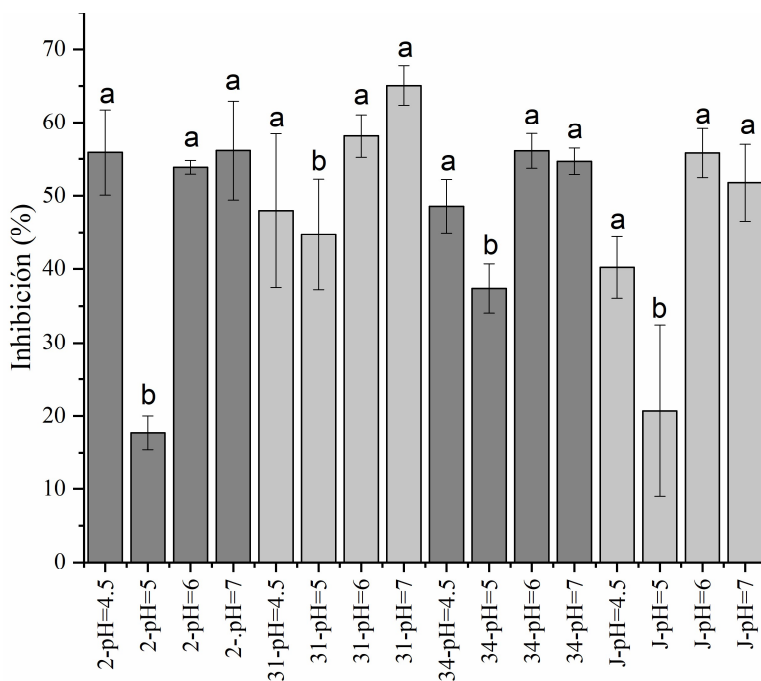


Figura 7.7. Efecto de la variación de pH sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de bacterias ácido lácticas de Costa de Marfil. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

## 7.5 Conclusiones

*A. carbonarius* Ac. 162 después de 72 h de cultivo en perlas de poliacrilamida presenta una baja actividad metabólica evidenciada por la disminución en la producción de CO<sub>2</sub>.

Como resultado de las pruebas realizadas con diferentes tiempos de cultivo se encontró que el SLC del cultivo de la cepa BAL 31 presentó la mejor respuesta inhibitoria

del crecimiento radial ya que alcanzó un valor de  $53.8 \pm 1.6$  (%) después de ser cultivada 96 h en condiciones de anaerobiosis.

Todas las cepas produjeron ácido láctico, propiónico y etanol, la cepa 31 también produjo ácido butírico y se obtuvo una mayor respuesta inhibitoria cuando se cultiva en anaerobiosis. La actividad antifúngica de los SLC a valores de pH por encima del pKa de los ácidos orgánicos sugiere la presencia de otros compuestos con actividad antifúngica.

## **8. Efecto de factores nutricionales y extracto de levadura sobre la actividad antifúngica del SLC de bacterias ácido lácticas**

### 8.1 Resumen

En esta sección se evaluó como es afectada la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 cuando se modifican la cantidad de fuente de nitrógeno y algunos factores nutricionales (citrato de amonio, cloruro de calcio y cloruro de sodio) puesto que se ha reportado que éstos estimulan la producción de compuestos con actividad antifúngica (Dalié et al., 2010). Se encontró que las BAL 7 de México y la 31 de Costa de Marfil presentaron la mayor actividad antifúngica. También se encontró que tanto el extracto de levadura como el citrato de amonio pueden ser reducidos o eliminados del medio de cultivo sin afectar el crecimiento y la actividad antifúngica. Por último, el cloruro de calcio tuvo un efecto negativo en la actividad antifúngica, mientras que el cloruro de sodio no tuvo ningún efecto sobre la inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162.

### 8.2 Introducción

Diversas investigaciones se han enfocado al estudio del efecto de los nutrientes en el crecimiento y actividad metabólica de las BAL (Dalié et al., 2010) (Lipińska et al., 2016). Se ha encontrado que la respuesta del metabolismo de estos microorganismos es distinta dependiendo de las condiciones químicas y físicas a las que están expuestos. Por lo tanto, el conocimiento de los factores que afectan la actividad metabólica es importante para optimizar y tener control del proceso de producción de metabolitos de interés industrial, en este caso particular los compuestos antimicrobianos.

Los nutrientes se pueden clasificar en esenciales, estimulantes y no esenciales. Los esenciales son imprescindibles para el desarrollo celular. Los nutrientes estimulantes mejoran el crecimiento y su ausencia lo desacelera. Por último, los no esenciales no tienen efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, juegan un papel importante en la optimización y el control de las actividades metabólicas (Hayek & Ibrahim, 2013).

Los minerales tienen un papel importante en el metabolismo, sirven como cofactores de una gran variedad de reacciones enzimáticas, participan en el transporte transmembranal, o bien, son componentes de moléculas (Hébert et al., 2009). En general, las BAL requieren  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$  como nutrientes que participan en el transporte o cofactores enzimáticos (Hayek & Ibrahim, 2013).

El extracto de levadura es un producto que contiene componentes solubles de células de levaduras y se utiliza como fuente de nitrógeno y vitaminas del grupo B. Como única fuente de nitrógeno es imprescindible su presencia para el crecimiento de BAL (Champagne et al., 1999). El medio MRS también contiene como fuente de nitrógeno, carbono, vitaminas y minerales extracto de carne y peptona. Sin embargo, su alto costo los hace poco factibles para el cultivo de BAL a escala industrial. Por lo tanto, prescindir de alguno de ellos o disminuir su cantidad en la formulación del medio de cultivo a escala industrial sin afectar el crecimiento y la capacidad inhibitoria favorecería su aplicación.

Dado que la modificación del medio de cultivo tiene un efecto sobre la actividad metabólica, la presencia de factores nutricionales podría aumentar la concentración de metabolitos antifúngicos durante el cultivo de BAL, por lo que se estudió el efecto del extracto de levadura, del citrato de amonio, del cloruro de calcio y del cloruro de sodio sobre la actividad antifúngica de las BAL.

Con base en los resultados obtenidos en el capítulo anterior, la cepa 31 fue seleccionada puesto que mostró la mayor inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162 ( $52.2 \pm 2.3$  %). Por otro lado, esta investigación forma parte de un proyecto cuyo objetivo es la “erradicación por biocontrol de la presencia de OTA sobre los granos de café”. Una etapa de este gran proyecto consiste en la selección y caracterización de microorganismos. Derivado de esta etapa, fueron aisladas cepas de BAL en México con actividad antifúngica denominadas BAL 3, BAL 7 y BAL 23, de las cuales fue seleccionada la cepa con mayor actividad antifúngica.

## 8.3 Materiales y métodos

### 8.3.1 Microorganismos

Para esta sección además de *A. carbonarius* Ac. 162, también se utilizó *A. carbonarius* Ac. 189, aislado en Costa de Marfil de cerezas de café (Djossou, et al., 2011), conservados a -20 °C bajo las condiciones descritas en la sección 6.3.1.

Con respecto a las BAL empleadas, la cepa BAL 31 fue seleccionada a partir de los resultados del capítulo 7 y además se utilizaron Las BAL aisladas de muestras de cerezas de café de México identificadas como *Lactobacillus plantarum* (3, y 7) y *Leuconostoc citreum* (23). Las cepas fueron conservadas bajo las mismas condiciones descritas en la sección 6.3.1.

### 8.3.2 Cultivo de bacterias lácticas

Para la activación de la BAL, se tomaron 50 µL de los cultivos conservados a -20 °C (descrito en la sección 7.3.1) en 9 mL de medio MRS estéril y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Posteriormente se realizó una primera resiembra con 1 mL del cultivo de activación y 9 mL de medio MRS estéril incubando a las mismas condiciones de activación. El medio de cultivo fue modificado con diferentes concentraciones de sales y nutrientes de acuerdo con un diseño experimental rotacional central compuesto de 3 niveles: cloruro de calcio (0, 2.5, 5 y 7.5 g/L), citrato de amonio (0, 1, 2, 3 g/L), extracto de levadura (0, 2.5, 5 y 7.5 g/L). En el caso del cloruro de sodio dado que no se encontraron valores centrales de referencia fueron propuestos valores de experimentación aleatorios (0, 7, 28 y 35 g/L). Posteriormente se realizó una segunda resiembra en botellas serológicas de 100 mL con 54 mL de medio MRS modificado en base a los tratamientos del diseño experimental rotacional central compuesto, que fueron inoculadas con 6 mL del cultivo de las BAL a partir de los cultivos de la primera resiembra. Las botellas fueron cerradas herméticamente, sonicadas y se hizo recircular una corriente de nitrógeno. El tiempo de incubación fue de 96 h a una temperatura de 30 °C. Para los cultivos con las diferentes concentraciones de extracto de levadura se tomaron muestras de 1 mL a las 0, 12, 24 y 48 h por duplicado para ser analizadas en un espectrofotómetro a 600 nm y realizar el conteo de UFC mediante curva patrón. La curva patrón se preparó mediante la técnica de conteo en placa con diluciones sucesivas ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) con Tween 80 al 0.1 % (v/v). Finalmente, los cultivos se centrifugaron a 8500 rpm durante 25 min a 4 °C y los sobrenadantes fueron filtrados con una membrana estéril (Nucleopore, Costar) de 0.45-µm de tamaño de poro, los SLC generados se refrigeraron a 4 °C hasta su utilización.



### 8.3.3 Cultivo de *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89

Para la activación de los hongos *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89 se tomaron 50  $\mu$ L de suspensión con esporas conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (sección 7.3.1) y se colocaron en matraces con 30 mL de medio PDA; se incubaron durante 7 días a  $30^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido este tiempo se agregaron 20 mL de solución estéril de Tween 80 (0.1% v/v) a los matraces para ayudar a desprender las esporas con un agitador magnético estéril removiendo suavemente durante 5 min. Se realizó una primera resiembra con 500  $\mu$ L de la suspensión de esporas en matraces con 30 mL de medio PDA y se incubaron durante 7 días a  $30^{\circ}\text{C}$ . Se realizó una segunda resiembra de la manera siguiente: se vertieron 20 mL de medio CYA estéril en cajas Petri (90 x 15 mm), se inocularon con 500  $\mu$ L de la suspensión de esporas y se incubaron por 7 días a  $30^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, fueron cortados discos esporulados de 8 mm de diámetro para ser utilizados como inóculo en la técnica de cultivos envenenados.

### 8.3.4 Determinación de la inhibición del crecimiento fúngico en medios envenenados

Para esta técnica fueron utilizadas cajas Petri (90 x 15 mm) por triplicado con 30 mL de una mezcla de medio PDA (agar 2x) y SLC (50:50 v/v) de los cultivos como se indica en la sección 8.3.2. En el centro de cada caja se colocó un disco de inóculo correspondiente a la segunda resiembra del apartado 8.3.2. Los cultivos se incubaron durante 48 h a  $30^{\circ}\text{C}$  y se midió el halo de crecimiento del hongo con un vernier. Como controles se utilizó medio PDA (agar 2x) y medio MRS (50:50 v/v). Los resultados se expresaron como inhibición (%) del crecimiento radial de acuerdo la siguiente expresión:

$$\text{Actividad antifúngica (\%)} = \frac{D_c - D_m}{D_c} \times 100 \quad \text{Ecuación 8.1}$$

Donde  $D_c$  y  $D_m$  son el diámetro de crecimiento de hongos para el control y la muestra, respectivamente.

### 8.3.5 Comparación preliminar entre las BAL de México y Costa de Marfil

Se realizó una comparación entre la BAL 31 de Costa de Marfil y 3 BAL aisladas en México (BAL 3, BAL 7 y BAL 23). La inhibición del crecimiento fúngico fue evaluada empleando los SLC correspondientes a los cultivos de las BAL incubadas en medio MRS durante 96 h a 30 °C. Los SLC fueron obtenidos centrifugando los cultivos a 3500 rpm durante 25 min a 4 °C y filtración con una membrana estéril (Nucleopore, Costar, 0.45- $\mu$ m).

#### 8.3.6 Cuantificación de ácido láctico

La concentración de ácido láctico se determinó por triplicado mediante un método isocrático (Diano et al., 2007) en un equipo para cromatografía de alta resolución (HPLC Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipado con una bomba LC-20 y un detector de índice de refracción RID-20, una columna Aminex HPX 87H, como fase móvil se utilizó H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5mM a un flujo de 600  $\mu$ l/min y una temperatura de horno de 60 °C.

#### 8.3.7 Análisis estadístico

Todos los análisis se realizaron por triplicado. Los resultados fueron expresados como media  $\pm$  el intervalo de confianza (ecuación 7.2). Se realizó un ANOVA de los datos y las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ). El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico PASW Statistics 18 (2016).

### 8.4 Resultados y discusión

#### 8.4.1 Comparación de la inhibición de *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89 por BAL de Costa de Marfil y México.

Factores nutricionales como el extracto de levadura, cloruro de sodio y el cloruro de calcio influyen en la producción de metabolitos antifúngicos por *Lactobacillus rhamnosus* y *Pediococcus acidilactici*. El aumento de glucosa a 1% en *Pc. acidilactici* y 2% para *Lb. rhamnosus* condujo a una mejora en la producción de metabolitos antifúngicos. El aumento a 1.5 % de extracto de levadura aumentó la producción de metabolitos antifúngicos en estas dos cepas.

La Figura 8.1 indica la inhibición del crecimiento radial efectuada por los SLC del cultivo de BAL sobre *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89. La menor inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 se observó con los SLC de las BAL 3 y 23 ( $29.8 \pm 5.1$  y  $32.7 \pm 1.8$  %, respectivamente). Por otro lado, las BAL 7 y la 31 presentaron la mayor respuesta inhibitoria ( $51.2 \pm 4.7$  y  $57.1 \pm 3.7$ %) y no mostraron diferencia significativa en el ANOVA ( $\alpha \leq 0.05$ ).

En lo que corresponde a los resultados para el hongo *A. carbonarius* Ac. 89 se obtuvo un bajo valor de inhibición con la BAL 23 ( $34.9 \pm 1.8$ %) mientras que las BAL 7, 23 y 31 inhibieron el crecimiento radial  $47.3 \pm 4.8$ ,  $51.3 \pm 1.4$  y  $52.2 \pm 2.4$  % respectivamente, no habiendo diferencia significativa entre las tres BAL ( $\alpha \leq 0.05$ ).

Con base en los resultados obtenidos, se eligió la BAL 31 de Costa de Marfil y la BAL 7 de México, para continuar los experimentos debido a que ambas cepas mostraron un mayor espectro de inhibición de *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89.

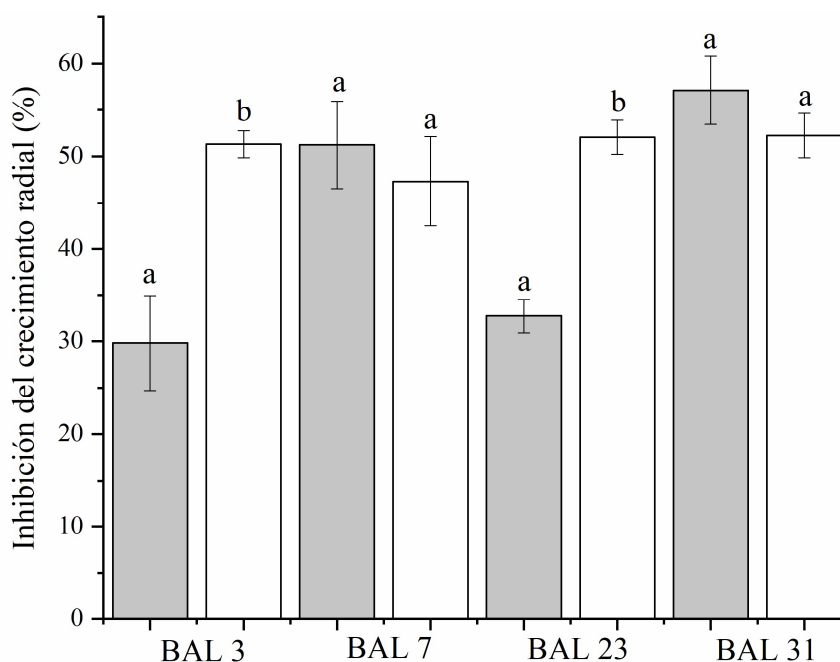


Figura 8.1. Inhibición de crecimiento radial (48 h) causada por los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de bacterias ácido lácticas (31, 3, 7 y 23) sobre *A. carbonarius* Ac. 162 (barras grises) y *A. carbonarius* DO89 (barras blancas). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4.2 Efecto de la variación de extracto de levadura sobre el metabolismo de BAL

Dado que el medio de cultivo MRS incluye como fuente de nitrógeno proteosa peptona (10 g) y extracto de carne (10 g) ambas BAL mostraron crecimiento al prescindir del extracto de levadura en la formulación del medio de cultivo. Para la BAL 7 se obtuvieron  $1.7 \times 10^{10} \pm 3.1 \times 10^8$  UFC/mL sin extracto de levadura en el medio de cultivo y no hubo diferencia significativa ( $\alpha \leq 0.05$ ) con la adición de 2.5, 5 y 7.5 g/L de extracto de levadura obteniendo cuentas de  $2 \times 10^{10} \pm 1.6 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^{10} \pm 3.0 \times 10^7$  y  $1.9 \times 10^{10} \pm 1.3 \times 10^8$  UFC/mL respectivamente. Por otro lado, para la BAL 31 en ausencia de extracto de levadura se alcanzaron  $3.7 \times 10^9 \pm 3.2 \times 10^7$  UFC/mL no habiendo diferencia significativa respecto del tratamiento con 2.5 g ( $\alpha \leq 0.05$ ), Cuando se agregaron 5.0 g/L de extracto de levadura la BAL 3 alcanzó  $4.1 \times 10^9 \pm 2.8 \times 10^7$  UFC/mL, sin diferencia significativa respecto del tratamiento con 7.5 g/L (Figura 8.2).

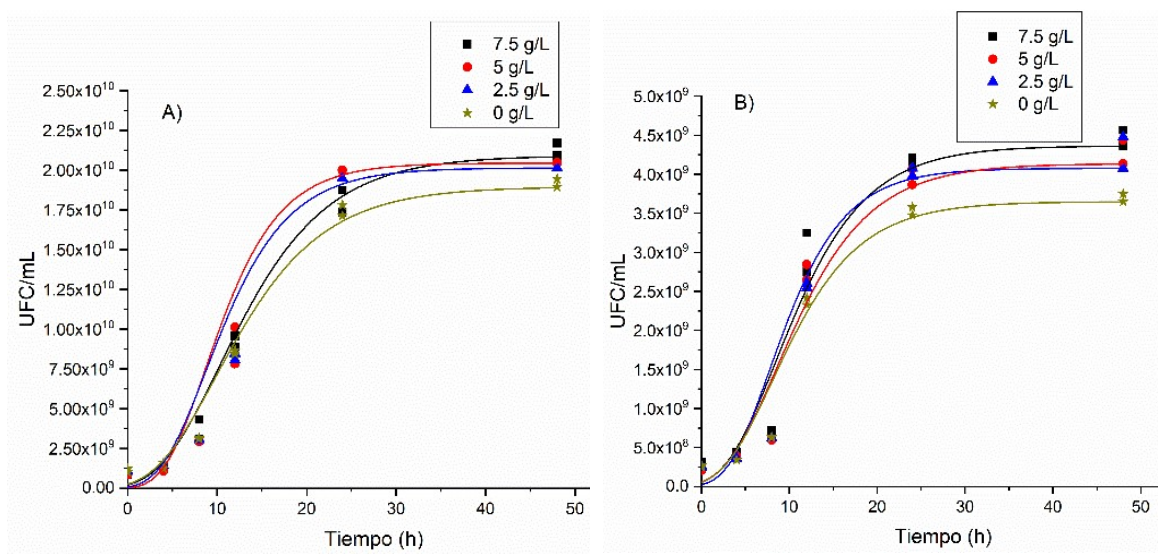


Figura 8.2. Curvas de crecimiento ajustadas al modelo de Gompertz (línea continua) para las cepas 7 (A) y 31 (B) a diferentes concentraciones de extracto de levadura.

Los resultados de los parámetros cinéticos del modelo de Gompertz (Tabla 8.1) fueron obtenidos utilizando el software Origin pro-2019. El ajuste del modelo a los datos experimentales presentó valores de  $R^2 > 0.95$  para todos los casos. Los valores de  $UFC_{max}$  /mL generados con el modelo correspondieron a los observados experimentalmente, por otro lado, las tasas de crecimiento no mostraron diferencia significativa entre concentraciones de la misma cepa ( $\alpha \leq 0.05$ ). Este resultado sugirió que la fuente de nitrógeno se encontraba en exceso y podría ser reducida la cantidad de extracto de levadura a la mitad en la formulación

(2.5 g/L) sin afectar el crecimiento de las BAL 7 y 31. Además se pudo observar que la BAL 31 tuvo un crecimiento más acelerado ( $k$ ), con respecto a la BAL 7 de aproximadamente el doble, tal comportamiento le confiere mayor potencial como microorganismo de biocontrol.

Tabla 8.1. Parámetros cinéticos del modelo de Gompertz del crecimiento de las BAL 7 y 31 a diferentes concentraciones de extracto de levadura.

<b>BAL 7</b>				
<b>Extracto de levadura</b>	<b>7.5 g/L</b>	<b>5.0 g/L</b>	<b>2.5 g/L</b>	<b>0 g/L</b>
<b>UFC<sub>max</sub>/mL</b>	2.1x10 <sup>10</sup> ± 2.0x10 <sup>9</sup>	2.7x10 <sup>10</sup> ± 4.7x10 <sup>9</sup>	2.4x10 <sup>10</sup> ± 4.2x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>10</sup> ± 2.8x10 <sup>9</sup>
<b><i>k</i> (h<sup>-1</sup>)</b>	0.15 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.04	0.14 ± 0.04
<b>R<sup>2</sup></b>	0.98	0.99	0.98	0.98
<b>BAL 31</b>				
<b>Extracto de levadura</b>	<b>7.5 g/L</b>	<b>5.0 g/L</b>	<b>2.5 g/L</b>	<b>0 g/L</b>
<b>UFC<sub>max</sub>/mL</b>	4.1x10 <sup>9</sup> ± 3.4 x10 <sup>8</sup>	4.1x10 <sup>9</sup> ± 3.3 x10 <sup>8</sup>	4.1x10 <sup>9</sup> ± 3.2 x10 <sup>8</sup>	3.9x10 <sup>9</sup> ± 3.3 x10 <sup>8</sup>
<b><i>k</i> (h<sup>-1</sup>)</b>	0.39 ± 0.11	0.39 ± 0.11	0.33 ± 0.09	0.34 ± 0.11
<b>R<sup>2</sup></b>	0.96	0.96	0.96	0.95

Un parámetro que se encuentra asociado al crecimiento de BAL homofermentativas es la producción de ácido láctico, puesto que se trata de un metabolito primario y su producción puede ser afectada por la cantidad de fuente de nitrógeno del medio de cultivo (Hujanen & Linko, 1994). Para ambas bacterias no se obtuvo diferencia significativa en ningún nivel de concentración de extracto de levadura ( $\alpha = 0.05$ ). Para la producción de este compuesto se observó (Tabla 8.2) que la BAL 31 mostró una producción ligeramente mayor de ácido láctico 13.76±0.17 g/L respecto a la BAL 7 (13.04±0.30 g/L). Estos resultados confirmaron la viabilidad de disminuir la concentración del extracto de levadura del medio de cultivo de las BAL 7 y 31 sin afectar el crecimiento o producción de ácido láctico.

Tabla 8.2. Producción de ácido láctico por BAL en medio MRS modificado con diferentes concentraciones de extracto de levadura después de 96 h de cultivo.

<b>Extracto de levadura (g/L)</b>	<b>BAL 7</b>			<b>BAL 31</b>	
	<b>Ac. láctico (g/L)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>		<b>Ac. láctico (g/L)</b>	<b>Intervalo de confianza</b>
7.5	12.92	0.24		13.76	0.17
5	12.72	0.30		13.31	0.21
2.5	13.04	0.30		13.61	0.18
0	12.58	0.28		13.48	0.15

Las Figuras 8.3 y 8.4 muestran los resultados obtenidos de la inhibición del crecimiento radial en placas de Petri de las dos cepas de *A. carbonarius* con diferentes concentraciones de extracto de levadura. Para los SLC obtenidos del cultivo de la BAL 7 con respecto al antagonismo de *A. carbonarius* Ac. 162 se alcanzó una inhibición de  $64.1 \pm 1.8$  % sin diferencia significativa entre los valores de concentración del extracto de levadura ( $\alpha = 0.05$ ). Un resultado similar se obtuvo para la inhibición de *A. carbonarius* Ac. 89 donde se alcanzó un valor de  $61.3 \pm 3.0$  %.

En cuanto a los resultados con los SLC del cultivo de la BAL 31 para inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* Ac. 162, se observó una ligera diferencia al utilizar un medio de cultivo sin extracto de levadura ( $55.3 \pm 3.4$ % de inhibición) respecto los tratamientos con 2.5, 5.0 y 7.5 g ( $69. \pm 0.5$ % de inhibición). Por otro lado, los resultados de la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 89 fueron similares, puesto que sin la adición de extracto de levadura ( $68.6 \pm 0.3$ %) y con los diferentes niveles de concentración evaluados (2.5-7.5 g/L) se obtuvo  $63.5 \pm 1.22$  % de inhibición. En la Figura 7.3 se muestran los halos de crecimiento de cada tratamiento. Con respecto a los controles con PDA (agar 2X) y medio MRS (50:50 v/v) las dos cepas de *A. carbonarius* tuvieron el mejor crecimiento, debido a la ausencia de inhibidores de crecimiento y a un enriquecimiento de nutrientes en el medio de cultivo generado. Cabe mencionar que la esporulación también se vio afectada por la presencia del SLC en todos los tratamientos, posiblemente este resultado se deba a un exceso de nutrientes en el medio de cultivo y este factor evite la esporulación.

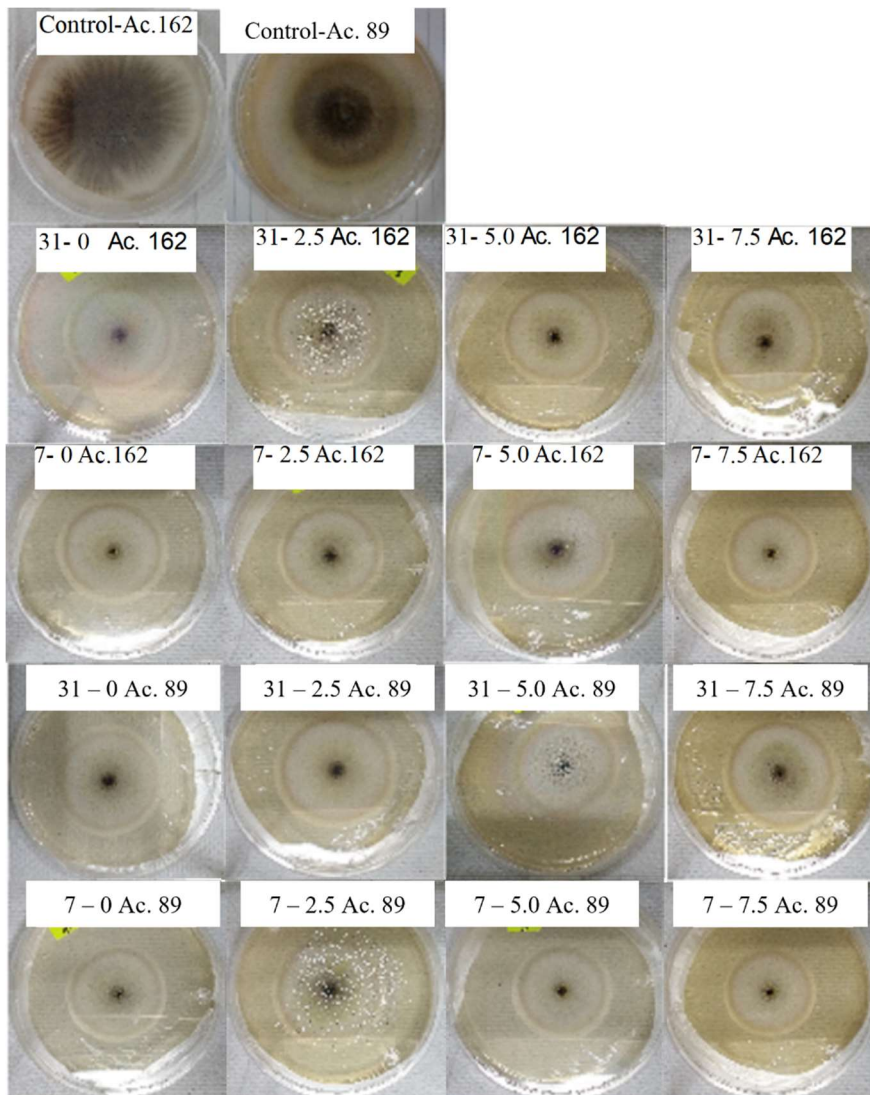


Figura 8.3. Crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac 162 y DO89 utilizando los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 7 y 31 variando la concentración de extracto de levadura (0, 2.5,5 Y 7.5 g/L) del medio de Man Rogosa y Sharpe.

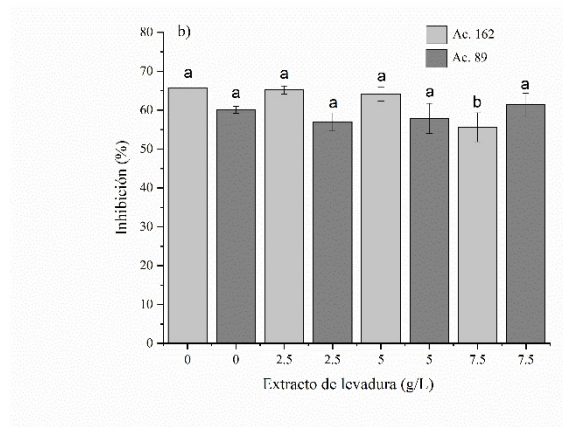
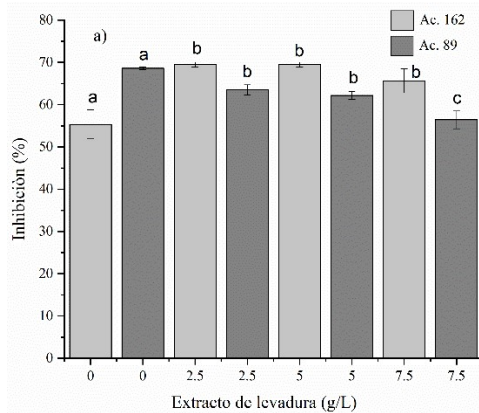


Figura 8.4. Efecto de la variación de la concentración de extracto de levadura sobre la inhibición del crecimiento radial de los sobrenadantes libres de células del cultivo de las BAL 31 (a) y 7 (b) en las dos cepas de *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 089. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4.3 Efecto de la adición de citrato de amonio sobre la actividad antifúngica

La Figura 8.5 muestra la inhibición del crecimiento radial de las dos cepas de *A. carbonarius* Ac. 162 y *A. carbonarius* Ac. 89 por los SLC del cultivo de la BAL 7 (México) y la BAL 31 (Costa de Marfil) con diferentes concentraciones de citrato de amonio en el caldo MRS. En cuanto a la inhibición de *A. carbonarius* Ac. 162 con los SLC correspondientes a la BAL 7 se alcanzó el  $49.6 \pm 4.3$  % de inhibición sin diferencia significativa entre las diferentes concentraciones de citrato de amonio. Por el contrario, cuando se evaluó el efecto de los SLC de las fermentaciones adicionadas con citrato de amonio de 0 a 2 g/L sobre *A. carbonarius* Ac. 89 no se obtuvo diferencia significativa con un valor de inhibición del  $26.4 \pm 1.9$  %. Cuando se adicionaron 3 g/L de citrato de amonio se presentó un aumento en la inhibición con un valor de  $38.9 \pm 2.5$  %.

Los resultados obtenidos para los SLC con las diferentes concentraciones de citrato de amonio en el cultivo de la BAL 31 no evidenciaron diferencia significativa con ninguna concentración en el porcentaje de inhibición obtenido de  $53.1 \pm 2.6$  % *A. carbonarius* Ac. 162. De igual manera no se obtuvo diferencia significativa en los valores de inhibición de *A. carbonarius* Ac. 89 a las diferentes concentraciones de citrato de amonio.



La composición del medio MRS utilizada en el cultivo de BAL incluye la adición de 2 g/L de citrato de amonio. Los resultados obtenidos en esta subsección sugieren que es posible la eliminación de este compuesto en la formulación del medio de cultivo, puesto que este no tuvo efecto en la actividad antifúngica. Axelsson et al., 1989 obtuvieron un resultado similar, ya que encontraron que la eliminación del citrato de amonio no afectó el metabolismo de *L. reuteri*. Por otra parte, se ha reportado que el citrato de amonio favorece la formación de acetoína y ácido fenil-láctico, dos compuestos con propiedades antimicrobianas (Dallagnol et al., 2011; Mortera et al., 2013).

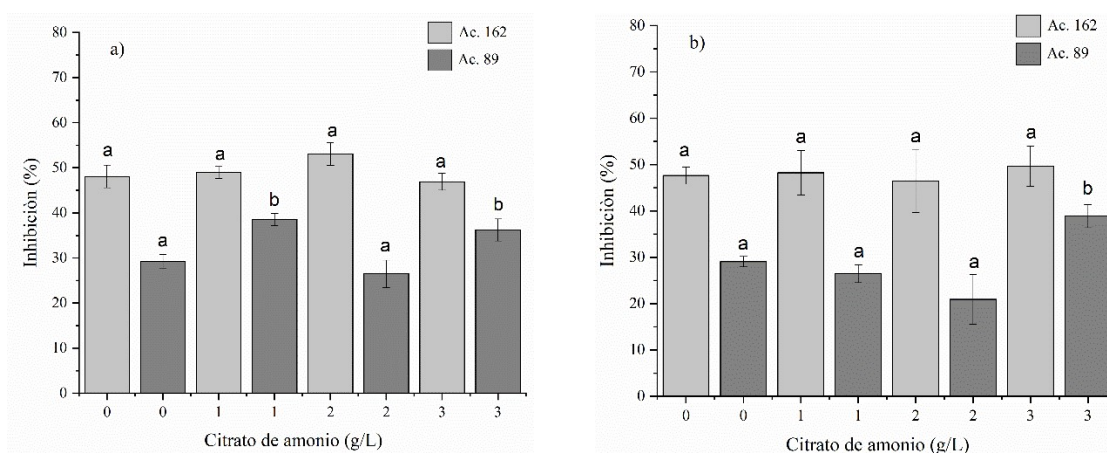


Figura 8.5. Efecto de la variación de la concentración de citrato de amonio sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b) en las dos cepas de *A. carbonarius* estudiadas. Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4.4 Efecto de la adición de cloruro de calcio sobre la actividad antifúngica

La Figura 8.6 muestra la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 y *A. carbonarius* Ac. 89, causada por los SLC de los cultivos de la BAL 31 (Costa de Marfil) y la BAL 7 (México) con diferentes concentraciones de cloruro de calcio en el medio MRS. Con la BAL 31 (Figura 8.6 a) hubo un efecto negativo en la actividad antifúngica con *A. carbonarius* Ac. 162 ya que se alcanzó  $67.8 \pm 3.4$  % de inhibición sin la adición de cloruro de calcio, sin diferencia significativa respecto del tratamiento con 1 g/L de cloruro de calcio. En cuanto a los tratamientos con la adición de 2 y 5 g/L de cloruro de calcio se obtuvo  $48.2 \pm 2.4$  % y  $52.2 \pm 3.5$  % de inhibición respectivamente, valores inferiores a los encontrados sin la

adición de cloruro de calcio. Por último, la actividad antifúngica contra *A. carbonarius* Ac. 89 no presentó diferencia significativa todas las concentraciones de cloruro de calcio ( $65.1 \pm 3.1$  % de inhibición).

Para la BAL 7 (Figura 8.6 b) se observó un efecto negativo sobre la inhibición del crecimiento de los hongos cuando se adicionó esta sal al medio de cultivo. Sin la adición de cloruro de calcio se obtuvo  $63.0 \pm 2.4$  % de inhibición para *A. carbonarius* Ac. 162 y  $64.5 \pm 2.5$  % para *A. carbonarius* Ac. 89 mientras que cuando se adicionó esta sal al medio de cultivo de la BAL 7, el SLC solo produjo valores menores al 60 % de inhibición.

Los resultados anteriores sugieren que los iones  $\text{Ca}^{++}$  podrían tener un efecto de competencia con otros metales divalentes que participan como cofactores en la producción de metabolitos con actividad antifúngica (Matevosyan et al., 2019), o bien, que están involucrados en el transporte transmembranal (Hayek & Ibrahim, 2013; Hébert et al., 2009) en lugar de actuar como estimulantes del metabolismo hacia la producción de compuestos antimicrobianos.

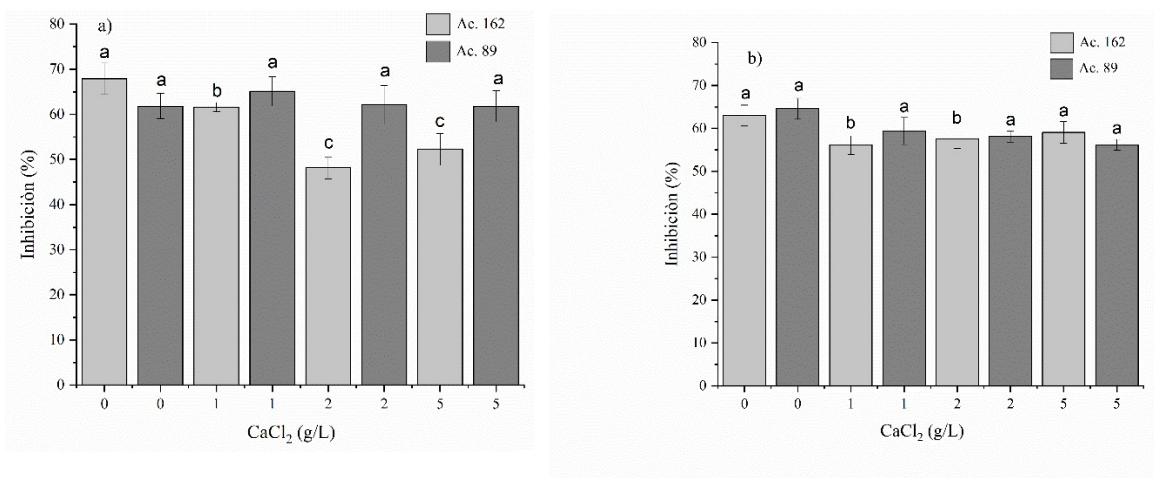


Figura 8.6. Efecto de la variación de la concentración de cloruro de calcio sobre la actividad antifúngica contra *A. carbonarius* Ac. 162 y Ac. 89 de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

#### 8.4.5 Efecto de la adición de cloruro de sodio sobre la actividad antifúngica

La Figura 8.7 muestra la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 y *A. carbonarius* Ac. 89, causada por los SLC del cultivo de la BAL 31 (Costa de Marfil) y la BAL 7 (México) con diferentes concentraciones de cloruro de sodio en el medio MRS.

Se puede observar que no se obtuvo diferencia significativa para ningún nivel de concentración de cloruro de sodio en ambas bacterias. Para la inhibición del crecimiento radial de *A. carbonarius* Ac. 162 con los SLC de la BAL 7 se obtuvo  $55.1 \pm 7.0$  % de inhibición y para la cepa Ac.89  $60.7 \pm 4.2$  %. Los resultados con relación a los SLC de la BAL 31 para la inhibición de *A. carbonarius* Ac. 162, se obtuvo  $54.1 \pm 7.1$  % de inhibición y para *A. carbonarius* Ac. 89 la inhibición fue de  $53.6 \pm 7.6$  %. Estos resultados sugieren que el moderado estrés osmótico causado por el cloruro de sodio para estas dos cepas no favorece la producción de compuestos antifúngicos ya que la actividad antifúngica es estable a las concentraciones de cloruro de sodio utilizadas en este estudio, un comportamiento muy similar fue obtenido por Crowley et al., 2013, a diferencia de los resultados obtenidos por Reis et al., 2012 donde la presencia de cloruro de sodio estimula la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471.

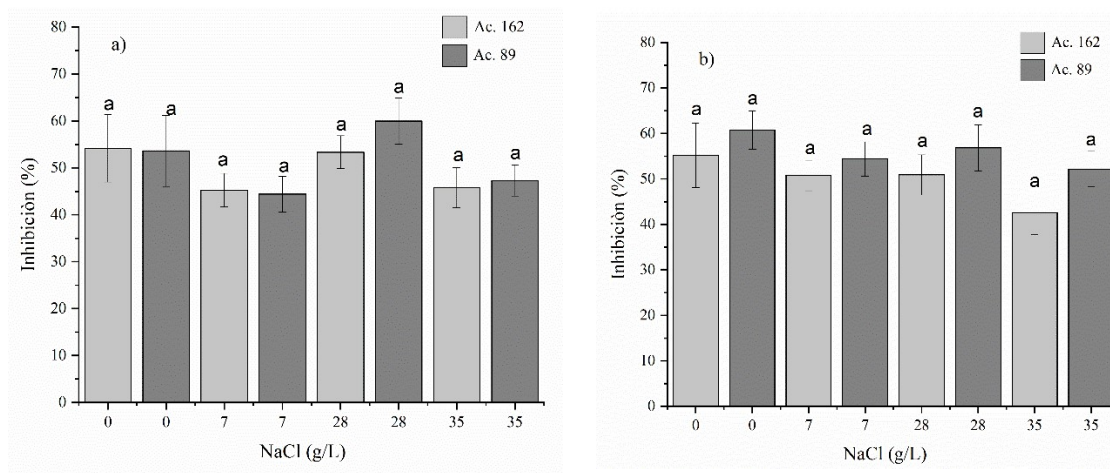


Figura 8.7. Efecto de la variación de la concentración de cloruro de sodio sobre la actividad antifúngica de los sobrenadantes libres de células del cultivo de 96 h de las cepas 31 (a) y 7 (b). Las letras sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

## 8.5 Conclusiones

Los resultados correspondientes a la inhibición del crecimiento radial utilizando los SLC de las BAL 7 y 31 cultivadas en medio MRS sin modificar presentaron la mayor

respuesta inhibitoria vs *A. carbonarius* Ac- 162 ( $51.2\pm 4.7\%$  y  $57.1\pm 3.7\%$  respectivamente) y Ac. 89 ( $47.3\pm 4.8$  y  $52.2\pm 2.4$  % respectivamente).

La fuente de nitrógeno se encuentra en exceso, por lo tanto, podría ser reducida la concentración de extracto de levadura a la mitad en la formulación del medio de cultivo (2.5 g/L) sin afectar el crecimiento y la capacidad inhibitoria de las BAL 7 y 31. De igual manera, el citrato de amonio no tiene efecto en la actividad antifúngica y puede ser eliminado del medio de cultivo.

Los iones  $\text{Ca}^{++}$  podrían tener un efecto antagonista con otros metales que participan en la producción de metabolitos con actividad antifúngica. Por último, el cloruro de sodio no favorece la producción de compuestos antimicrobianos por las BAL 7 y 31 y la actividad antifúngica fue estable a las concentraciones de cloruro de sodio utilizadas en este estudio.

## **9. Polyols induce the production of antifungal compounds by *Lactobacillus plantarum***

### 9.1 Abstract

Mycotoxins may be present in nuts, coffee, cereals, and grapes, among other products. Increasing concerns about human health and environmental protection have driven the application of biological control techniques that can inhibit fungal contaminants. In this study, the growth inhibition of the ochratoxigenic fungus *Aspergillus carbonarius* Ac 162 was evaluated using 5 lactic acid bacteria (LAB). The LAB studied were *Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34), isolated in the Ivory Coast, and *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23), isolated in Mexico. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory. LAB were cultivated in De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth, and different polyols (glycerol, mannitol, sorbitol, and xylitol) were added to the culture broth to stimulate the production of antifungal compounds. The fungal inhibition studies were performed using the poisoned food technique. The highest inhibition of *A. carbonarius* growth was obtained by cultivating *L. plantarum* MZ809351 in the presence of xylitol and glycerol. Under these conditions, 1 L of the *L. plantarum* MZ809351 cultures were used to identify antifungal compounds. The compounds were concentrated by solid-phase extraction and then characterized by GC-MS. In addition to 9-octadecenoic acid, 3 diketopiperazines or cyclic dipeptides were identified, including cyclo (Leu-Leu), cyclo (Pro-Gly) and cyclo (Val-Phe), which were compounds related to microbial antifungal activities. Xylitol and glycerol induced the production of these antifungal compounds against *A. carbonarius* Ac 162. On the other hand, adding xylitol and glycerol to the MRS broth reduced the Ochratoxin A (OTA) content to 56.8 and 54.7%, respectively. This study shows the potential for using *L. plantarum* MZ809351 as a biocontrol agent to prevent the growth of *A. carbonarius* and reduce the production of OTA in foods.

### 9.2 Introduction

Microbial spoilage of foods is the primary reason for food loss, and it is responsible for 1.3 billion tons of food loss every year (Leyva Salas et al., 2017). Crop losses close to 25% occur every year worldwide and have a significant economic impact (Marin et al., 2013). Mycotoxins have been detected in several foods, particularly in nuts, coffee, cereals, and grapes. Ochratoxin A (OTA) is a mycotoxin associated with various neurotoxic, genotoxic, and teratogenic disorders, among others, in animals and humans (Amézqueta et al., 2012). The primary microorganisms responsible for the production of mycotoxins belong to the genera *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* (Ogunade et al., 2018). The most relevant OTA-producing species are *P. verrucosum*, *A. ochraceus*, *A. niger* and *A. carbonarius* (Amézqueta et al., 2012). *Aspergillus carbonarius* Ac162 has been reported to be an OTA hyperproducer, producing up to 0.037 mg/g of agar in culture media (Djossou, Perraud-Gaime, et al., 2011).

The development of fungal contaminants can be controlled using chemical and physical methods (Lee et al., 2008). However, potential environmental and human health risks have promoted the application of biological control techniques as alternative methods (Wu et al., 2015). One of these methods is the use of generally recognized as safe (GRAS) microorganisms and their metabolites (Kumar et al., 2019), such as lactic acid bacteria (LAB), to inhibit the development of contaminants (Gerez et al., 2013).

LAB are gram-positive microorganisms that produce lactic acid as the major product of their primary metabolism (Stoianova et al., 2012), and they exhibit antimicrobial properties (Todorov & Dicks, 2005). Several metabolites are produced by LAB during their primary (lactic acid, acetic acid, hydrogen peroxide) and secondary metabolisms, including diacetyl, reutericyclin, 3-phenyllactic acid, benzoic acid, methylhydantoin, benzeneacetic acid, 2-propenyl ester, mevalonolactone, 2,6-diphenylpiperidine, proteinaceous compounds, diketopiperazines and other low-molecular weight compounds (Kharazian et al., 2017; Kwak et al., 2013; Yang et al., 2011). Diketopiperazines or cyclic dipeptides are metabolites associated with quorum sensing and antimicrobial properties (Kwak et al., 2013).

Due to the immense diversity of antimicrobial compounds produced by LAB, there are several inhibitory mechanisms present. For example, the inhibition by organic acids is related to the permeation of the nondissociated acid through the cellular membrane and the insolubility of the dissociated form of the organic acids in the cytoplasm, which causes

acidification and failure of proton motive forces (Reis et al., 2012). On the other hand, the antimicrobial effect of the hydrogen peroxide produced by LAB has been attributed to the peroxidation of membrane lipids, which increases membrane permeability and destroys protein structures (Özogul & Hamed, 2018). Regarding diketopiperazines, the dehydrogenated derivatives of cyclic dipeptides have been reported to cause the inhibition of cell division (Martins & Carvalho, 2007).

The MRS (Man, Rogosa and Sharpe) broth is a reference medium for the cultivation of LAB. The composition of the culture medium modulates the bacterial metabolism and the production of antifungal compounds in LAB cultures (Dalié et al., 2010; Microbiol et al., 2016), and the addition of polyols to MRS broth has been shown to promote the production of antimicrobial compounds (Lipińska et al., 2016). Using MRS broth supplemented with several polyols, this work aimed to select a lactic acid bacterium with antifungal activities and identify the compounds it produced.

### 9.3 Materials and methods

#### 9.3.1 Molecular identification of LAB strains

The selected strains of lactic acid bacteria were identified using 16 rRNA gene sequencing, which was performed at the National Genomics Laboratory for Biodiversity (Irapuato, Mexico) using universal primers 27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 800R 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3', 785F 5'-GGATTAGATACCCTGGTA-3' and 1492R 5'-CGGTTACCTTGTTACGACTT-3'. The sequences were compared with the GenBank library to look for homologous sequences using the BLAST tool (Basic Local Alignment Search Tool) available at <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

#### 9.3.2 Cultivation of LAB and production of a cell-free culture filtrate (CCF)

LAB were isolated from coffee pulp; three strains (*Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *L. plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34)) isolated in the Ivory Coast (Djossou et al., 2011) and two LAB strains (*Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconosctoc citreum* MZ801735 (23)) isolated in Mexico

were evaluated in this study. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory.

LAB activation was carried out by inoculating 50- $\mu$ L aliquots of the strains preserved in a cryoprotective medium (MRS broth:glycerol (50%, v:v) maintained at -18 °C) in assay tubes containing 9 mL of MRS broth (Difco™, Sparks, USA). The composition of the MRS broth was as follows (g/L): proteose peptone No. 3, 10; beef extract, 10; yeast extract, 5; dextrose, 20; polysorbate 80, 1; ammonium citrate, 2; sodium acetate, 5; magnesium sulfate, 0.1; manganese sulfate, 0.05; and dipotassium phosphate, 2. The LAB strains were cultivated once at 30 °C for 24 h, and 1 mL of this activated culture was used to inoculate 9 mL of the MRS broth supplemented with 10 g/L mannitol, xylitol, sorbitol, or glycerol (Sigma–Aldrich) and was cultivated again under anaerobic conditions (BD GasPak™ EZ container). The main carbon source in the MRS broth is glucose (20 g/L), and 50% of this concentration was replaced by each polyol (10 g/L). Inoculated MRS broth without polyols was used as in control assay. Finally, a second cultivation was made in serological bottles; 6 mL of the first cultivation was used to inoculate 54 mL of MRS broth supplemented with 10 g/L polyols. The cultures were incubated for 96 hours at 30 °C, and samples were collected each day for HPLC analysis. The cell-free culture filtrates (CCFs) of cultures were obtained by centrifugation (7 000 rpm, 10 min, 4 °C), followed by filtering the supernatants through 0.45- $\mu$ m membrane pore-size filters (Nucleopore, Costar).

### 9.3.3 Determination of polyols by HPLC

The concentration of polyols for the different assays (LAB strain cultures supplemented with polyols and their control assays) was quantified in duplicate by HPLC using an isocratic method (Su et al., 2015). The samples were membrane-filtered (0.2  $\mu$ m), and proper dilutions were prepared according to a calibration curve. The retention times (min) obtained for the different compounds are shown in Table 9.1. The analysis was carried out using a Shimadzu Prominence HPLC system (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with an LC-20 pump and an RID-20A refractive index detector. The column (Aminex HPX-87H) was eluted at 60 °C with 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as the mobile phase at a flow rate of 600  $\mu$ L/min.



Table 9.1. Retention times for polyols detected postfermentation by HPLC using an isocratic method based on a standard curve (0.5-10 g/L).

<b>Polyol</b>	<b>Retention time (min)</b>	<b>Std. deviation</b>
Mannitol	12.59	0.004
Sorbitol	13.03	0.003
Xylitol	3.86	0.001
Glycerol	15.34	0.003

#### 9.3.4 Antifungal activity assays

The *A. carbonarius* strain Ac 162 (*A. carbonarius*) was isolated from coffee cherries and selected as the ochratoxigenic fungus (Djossou et al., 2011). Fungal inhibition assays were performed for all LAB strains cultivated in a medium MRS supplemented with the test polyols (mannitol, sorbitol, xylitol, glycerol), and cultures of LAB without polyols were used as the control assays. *A. carbonarius* was isolated and identified by a method previously reported by Djossou et al., 2011; the strain was activated by inoculating a 50- $\mu$ L aliquot of the cryoprotective medium (Czapek yeast extract broth and glycerol, 50% v:v) in a flask containing 30 mL of potato dextrose agar (PDA, BD BIOXON) and incubated at 30 °C for 7 days. The spores were harvested using 20 mL of polysorbate 80 (0.1%, v/v), and 500  $\mu$ L of the spore suspension was incubated in a flask containing 30 mL of PDA and cultured at 30 °C for 7 days. Subsequently, a spore suspension ( $1 \times 10^6$  spores/mL) was prepared using an appropriate dilution after counting the spores in a Neubauer hemocytometer. The poisoned food method (Balouiri et al., 2016) was performed in sextuplicate, and the antifungal agents present in the CCF were incorporated using a mixture of 30 mL (1:1, v:v) of the CCF and molten PDA (2X agar) in Petri dishes (90 $\times$ 15 mm). The plates were incubated at 30 °C for 72 h. One hole (8 mm in diameter) was punched in the centre of each Petri dish, after which 100  $\mu$ L of an *A. carbonarius* spore suspension ( $1 \times 10^6$  spores/mL) was inoculated into the holes. The diameter of fungal growth was measured, and statistical analyses (one-way

ANOVA) were performed. The resultant antifungal inhibition was determined using the following equation:

$$\text{Antifungal activity (\%)} = \frac{D_c - D_s}{D_c} \times 100 \quad (9.1)$$

where  $D_c$  and  $D_s$  are the diameters for fungal growth in the control and sample assays, respectively. The control assays were performed in sextuplicate by inoculating Petri dishes containing 15 mL of PDA (2X agar), and 15 mL of the MRS broth without fermentation was inoculated with 100  $\mu$ L of *A. carbonarius* ( $1 \times 10^6$  spores/mL) into the holes in the agar in the Petri dishes.

### 9.3.5 Determination of OTA by HPLC

The OTA content of the samples was analysed following a previously reported methodology (Durand, 2012). According to the procedure of the poisoned media technique, the *L. plantarum* MZ809351 strain presented the highest antifungal activity and was selected for determining OTA production. Determination of OTA was carried out using the poisoned media technique (Balouiri et al., 2016) with PDA (2X) and the CCF from *L. plantarum* MZ809351 cultures with the different polyols studied, as well as their respective controls as indicated in the antifungal assays. The Petri dishes were incubated at 30 °C for 7 days. *A. carbonarius* was grown on PDA under the same conditions (30 °C for 7 days), and this assay was considered an additional control. Several discs (4) of agar (approximately 6 x 2 mm, diameter x depth) were taken from the periphery of the fungal colony. OTA extraction from the discs was carried out by adding 2.5 mL of a methanol-formic acid solution (25:1; v: v) and sonicating for 20 min. The extracts were membrane-filtered (Millex 25; 0.45  $\mu$ m PTFE, Agilent Technologies). The extracts were completely evaporated under a stream of nitrogen (70 °C) and subsequently resuspended in 1 mL of a water/methanol/acetic acid mixture (30:69:1; v:v). The OTA quantification of the obtained extracts (Durand, 2012) was carried out using an HPLC equipped with a fluorescence detector (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan). The operating conditions were as follows: the injection volume was 50  $\mu$ L; a C18 reverse-phase column with a guard column made of the same material was used (ODS 5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm); the temperature was maintained constant at 35 °C; and an isocratic flow of 1

mL/min of the mobile phase (water/methanol/acetic acid, 69:1 (v: v)) was used. The excitation wavelength was 333 nm, and the emission wavelength was 460 nm. The OTA retention time was 6.6-7.2 min. The calibration curve was prepared with an OTA standard (Sigma–Aldrich®). The results of OTA determination were expressed as µg OTA/g agar.

### 9.3.6 Identification of antifungal compounds

The extraction of antifungal compounds was performed using a solid-phase extraction (SPE) column, and the identification of compound gases was carried out by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC–MS). As previously described, the CCFs were fractionated on an SPE column (Mega BE-C18, 10 g mass bed, Agilent Technologies, Inc. USA, 14 cm length × 3 cm diameter) (12). The SPE columns were activated with 200 mL of methanol and equilibrated with 200 mL of an aqueous 10 mM sodium acetate solution. A sample of 1 L for each culture medium was loaded onto an SPE column, and the eluate 1 was recovered by flow-through. Eluate 1 was considered a negative control with no antifungal activity. Subsequently, the columns were washed with 200 mL of aqueous acetonitrile (5% v: v), this liquid was discarded, and the column was eluted again with 30 mL of 95% aqueous acetonitrile to recover the eluate 2. Eluate 2 was concentrated in a rotavapor (Buchi, R-100) and resuspended in 1 mL of acetonitrile; it was called the concentrated sample of antifungal compounds.

The antifungal compounds were identified using GC–MS. An Agilent 6890N gas chromatograph equipped with an HP-5MS capillary column (30 m in length, 0.32 mm in diameter, with a 0.25 µm-sized stationary phase) coupled to an Agilent 5973 mass spectrometer with a selective mass detector was used. The operation conditions were as follows: helium was used as the carrier gas (1 mL/min). The injection port temperature was set to 250 °C. The injection volume was 1.0 µL, and the split ratio was 100:1. The temperature program was as follows: the temperature was held at 50 °C for 2.5 min, then raised from 50 °C to 180 °C at 2.5 °C/min, then from 180 °C to 230 °C at 5.5 °C/min, and finally, held at 230 °C for 1 min. The electron ionization (EI) mode was used at 70 eV with a scanning range of 40–550 m/z. The total analysis time was 92 min, and the processing of all results was recorded using an MSD ChemStation software version G1701DA D.01.00 (Stamatelopoulou

et al., 2018). The identification of the compounds was based on a 90% similarity between the MS spectra of unknown and reference compounds in the Wiley7n library. The mass spectra of the compounds were compared with the National Institute of Standards and Technology (NIST) database to determine their structure and molecular weights.

### 9.3.7 Antifungal activities of concentrated samples (eluate 2)

The antifungal activities of the concentrated samples of antifungal compounds were evaluated using 15, 45 and 90  $\mu\text{L}$  of the samples in the poisoned food method (Balouiri et al., 2016). The smaller volume (15  $\mu\text{L}$ ) corresponded to the inhibition tests, where 15 mL of the CCFs was used in the antifungal activity assays. This volume was estimated by assuming that the total extraction of antifungal compounds was contained in 15  $\mu\text{L}$  concentrated samples. This assumption was not experimentally verified, and larger volumes (45 and 90  $\mu\text{L}$ ) were also applied. PDA-containing Petri dishes were inoculated with 100  $\mu\text{L}$  of *A. carbonarius* ( $1 \times 10^6$  spores/mL), and the cultures were incubated for 72 h at 30 °C.

### 9.3.8 Statistical analysis

Completely randomized experimental designs were applied to all the assays. Data were presented as means  $\pm$  standard deviations. Each fungal inhibition assay was performed in sextuplicate. The data were analysed, and the treatments were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post-hoc test ( $p < 0.005$ ) to find statistically significant differences between the conditions assayed. ANOVA was carried out considering the following factors: LAB strains (5 factors: J, 31, 34; 3, and 23) and polyols (5 factors: mannitol, sorbitol, xylitol, glycerol and MRS without polyol addition as a control assay). The analysis of interacting factors was performed by Tukey's test. The statistical analysis of the data was performed using the statistical package PASW Statistics 18.

## 9.4 Results

### 9.4.1 Molecular identification of LAB strains

A comparison of the sequences for molecular identification of the lactic acid bacteria (ESM at the end of this manuscript) was performed using the NCBI public database. The results of the sequentiations are given after the references. The three strains from the Ivory Coast were identified as *Lactobacillus plantarum* (*Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34)). The Mexican strains of LAB were identified as *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23). The LAB strain 31 was previously genotypically characterized by Djossou et al., 2011. In this work, the LAB strain 31 was also identified as *Lactobacillus plantarum*, confirming the results reported.

#### 9.4.2 Growth inhibition of *Aspergillus carbonarius* Ac 162 and consumption of polyols

The *A. carbonarius* growth inhibition assays were performed for all the LAB strains from the Ivory Coast (*L. plantarum* MZ801739, *L. plantarum* MZ809351 and *L. plantarum* MZ809350) and from Mexico (*L. plantarum* MN982928 and *L. citreum* MZ801735) using all the studied polyols (mannitol, sorbitol, xylitol, and glycerol). MRS cultures without the addition of polyols were considered the control assays. Fig. 9.1 shows the increase in fungal growth inhibition (%) under the different conditions studied using the poisoned food method (Balouiri et al., 2016). The inhibition of growth of *A. carbonarius* caused by the strain *L. plantarum* MZ809351 in the presence of glycerol and xylitol was significantly different from the other treatments. Under these conditions, the error bars with *L. plantarum* MZ809351 (31) do not overlap with the other conditions assayed, indicating statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). These treatments exhibited the highest growth inhibition of *A. carbonarius* (85.7-86.7%) with low variation coefficients, 6.8 and 7.9%, respectively (Fig. 9.1), indicating low experimental error.

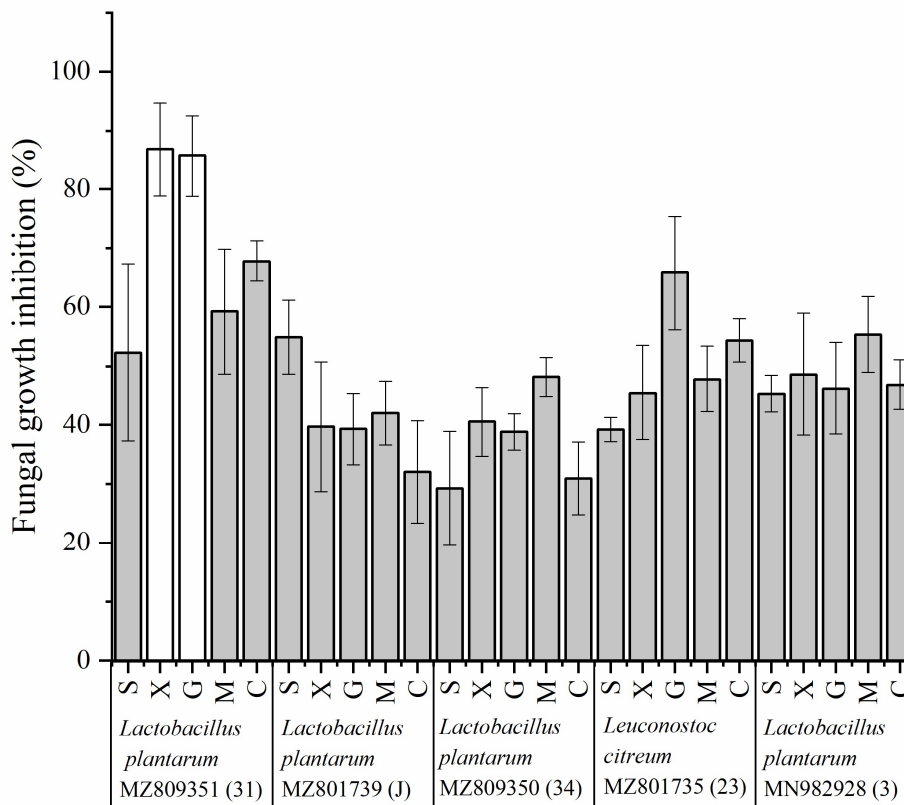


Fig. 9.1 Inhibition of *A. carbonarius* growth (%) using five LAB strains. The LAB studied were *Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34) isolated in the Ivory Coast and *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23) isolated in Mexico. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory. The LAB strains were cultured with xylitol, X; glycerol, G; mannitol, M; sorbitol, S; control, C (PDA 2X and MRS broth). The white bars represent significant differences (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ) for the interactions (strain and polyol). The error bars with *L. plantarum* MZ809351 (31) in the presence of glycerol and xylitol did not overlap with the other conditions assayed, indicating statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

The results for the consumption of polyols added to the MRS broth showed that sorbitol and mannitol were rapidly consumed, showing a polyol uptake of more than 80% in 24 h, whereas xylitol and glycerol were not assimilated (Fig. 9.2), except by the strain *L. citreum* MZ801735, which showed a glycerol uptake of 40% in 72 h. These results agree with those reported earlier (5), where *L. plantarum* MZ809351 fermented mannitol and sorbitol while glycerol and xylitol were not assimilated; all the strains of *L. plantarum* reported by Djossou et al., 2011 exhibited the same behavior. The consumption of polyols by *L. plantarum* MZ809351 showed similar trends to those previously reported (25); mannitol was consumed while the xylitol concentration remained constant.

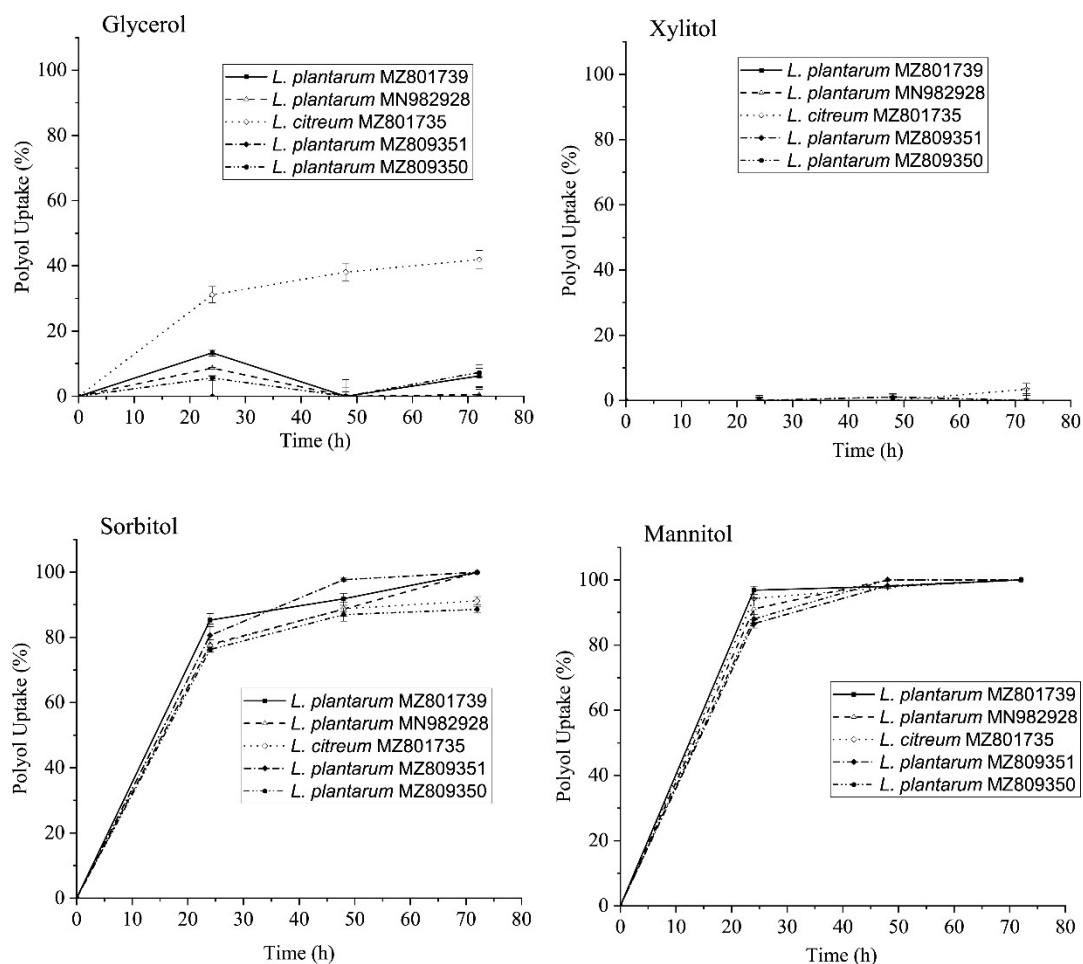


Fig. 9.2. Consumption of polyols (%) in Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broths by five lactic acid bacteria. *Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J), *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) and *Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34) were isolated in the Ivory Coast and *Lactobacillus plantarum* MN982928 (3) and *Leuconostoc citreum* MZ801735 (23) were isolated in Mexico. J, 31, 34, 3 and 23 are the internal strain codes from our laboratory.

#### 9.4.3 Determination of the production of OTA

Determination of OTA was carried out using poisoned media assays (Balouiri et al., 2016) with PDA (2X) and the CCF from *L. plantarum* MZ809351 cultures with the different polyols studied, as well as their respective control assays (Fig. 9.3). In the PDA medium, the highest concentration of OTA was determined ( $87.3 \pm 10.0$   $\mu\text{g/g}$  of agar). The treatment in the MRS medium supplemented with mannitol did not show a significant difference from the respective PDA controls without the addition of CCF ( $p > 0.05$ ). In the case of the control assay in the MRS medium without polyols added, *A. carbonarius* produced  $49.6 \pm 8.3$   $\mu\text{g}$  OTA/g agar. In contrast, with the addition of glycerol, xylitol, and sorbitol, production of  $39.5 \pm 10.7$ ,  $37.7 \pm 2.7$  and  $28.2 \pm 6.2$   $\mu\text{g}$  of OTA/g of agar, respectively, was obtained (Fig. 9.3).

Under the best conditions tested, a 67.7% reduction in OTA production was observed in the presence of sorbitol; nevertheless, fungal growth inhibition was  $52 \pm 15\%$ . The reduction in OTA production using the addition of xylitol and glycerol to the medium was 56.8 and 54.7%, respectively. These treatments exhibited the highest growth inhibition of *A. carbonarius* (85.7-86.7%). Therefore, the CCFs of *L. plantarum* MZ809351 with xylitol and glycerol were selected to extract and identify metabolites with antifungal activities.

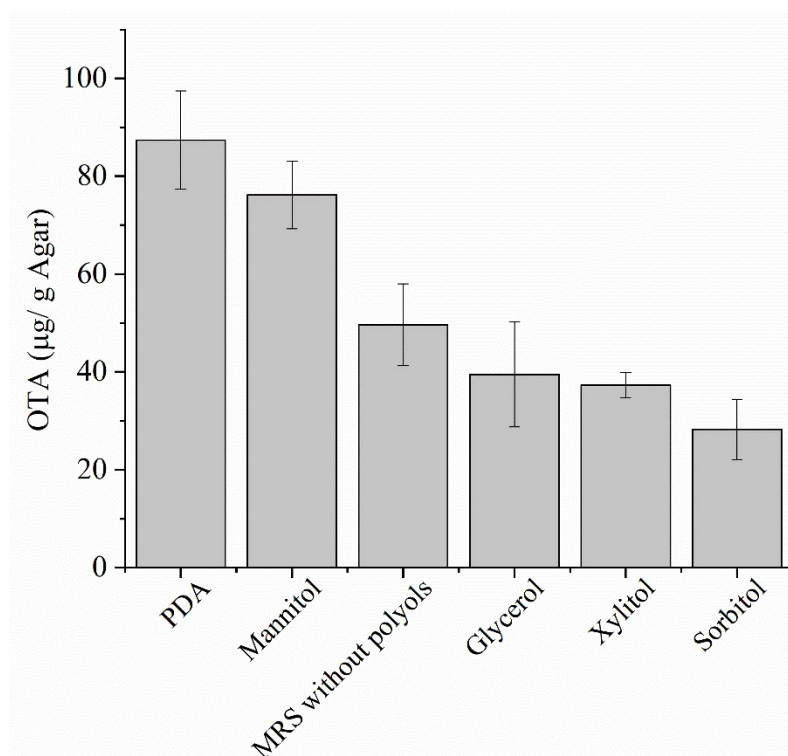


Fig. 9.3. Production of OTA from the poisoned plate cultures of *Aspergillus carbonarius* Ac. 162 with the culture cell filtrate of *L. plantarum* MZ809351 (31) fermented with different polyols. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

#### 9.4.4 Evaluation of the antifungal activity extracts

The antifungal activity of eluate 1 (negative control) from *L. plantarum* MZ809351 (cultured with xylitol and glycerol) was evaluated against *A. carbonarius*. (Fig. 9.4) shows that the *L. plantarum* MZ809351 extracts cultured with glycerol and xylitol did not exhibit any antifungal activity, suggesting that antifungal compounds were not present in eluate 1; therefore, it was confirmed to be a negative control.



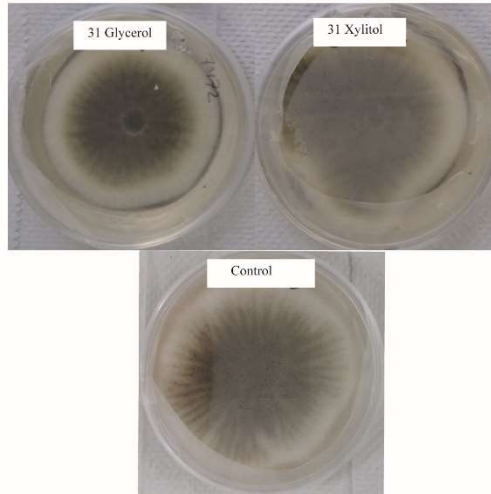


Fig. 9.4. Growth inhibition of *A. carbonarius* using the poisoned food technique of eluate 1 (negative control) of treatments with *Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31) cultured in the presence of xylitol, X; and glycerol, G.

The methodology used in this study is oriented to the recovery of cyclic dipeptides with antifungal activity in the concentrated samples (eluate 2) considered the positive assays. The antifungal activities of these concentrated samples are shown in Fig. 9.5. Ninety microlitres of acetonitrile was also used as a control, and the data were used to estimate the inhibition of fungal growth (%). *A. Carbonarius* growth inhibition was higher when the volumes of the concentrated samples of eluate 2 were increased.

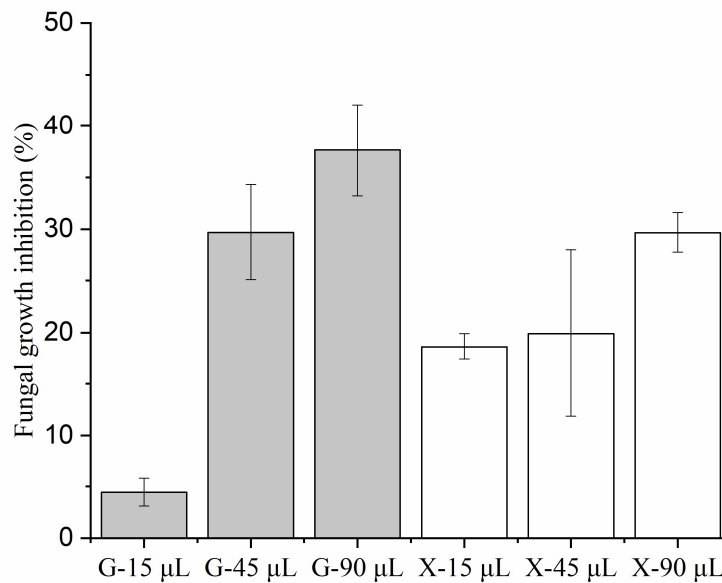


Fig. 9.5 Inhibition of *A. carbonarius* growth (%) using different volumes (15, 45 and 90 µL) of concentrated samples of eluate 2 from *L. plantarum* MZ809351 (31) (cultured with xylitol, X; and glycerol, G) after culturing for 72 h.

#### 9.4.5 Identification of antifungal compounds

Fig. 9.6 presents the GC–MS chromatograms of the concentrated samples (eluate 2) from *L. plantarum* MZ809351 in the presence of xylitol and glycerol. The total duration of analysis was 92 min; between 0 to 48 minutes, no signals were obtained. Diketopiperazines could be produced during the sterilization of MRS broth, which can interfere with the evaluation of antifungal activities of diketopiperazines produced by LAB (Lind et al., 2007); for that reason, sterilized MRS broth without the addition of polyols were used as a control.

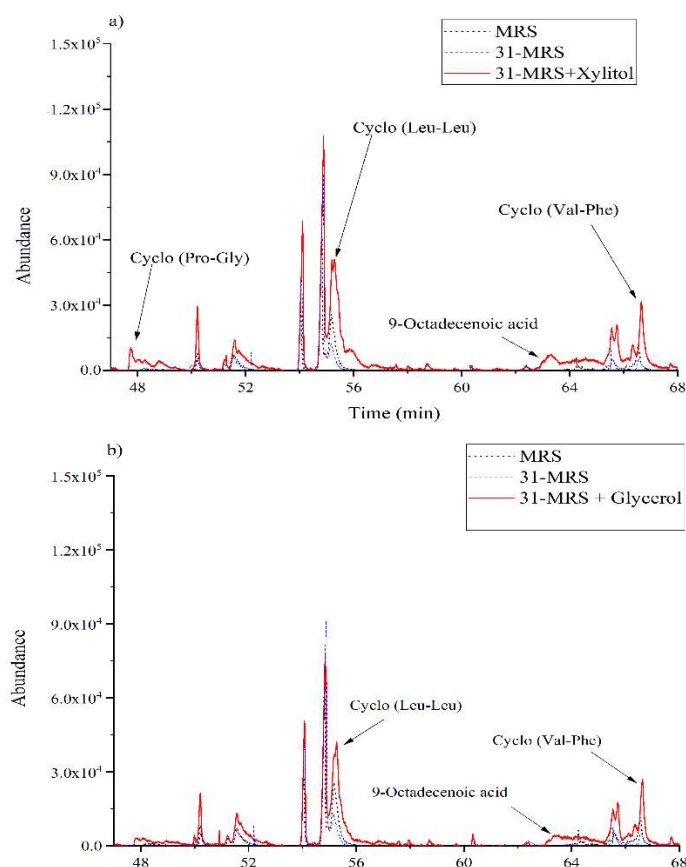


Fig. 9.6 GC–MS chromatograms of concentrated samples (eluate 2) from *L. plantarum* MZ809351 (31) cultured in the presence of xylitol and glycerol. The chromatograms for the MRS broth without inoculation are shown as black lines, while the dashed lines represent the concentrated samples and the dotted lines represent the strains cultivated in MRS broth without polyols.

In the presence of xylitol, *L. plantarum* MZ809351 produced three diketopiperazines or cyclic dipeptides, cyclo (Pro-Gly), cyclo (Leu-Leu) and cyclo (Val-Phe), as well as 9-octadecenoic acid (Fig. 9.7). In contrast, this strain did not produce cyclo (Pro-Gly) in the presence of glycerol. The mass spectra of the compounds are shown in Fig. 9.7. The three

identified diketopiperazines have been reported to exhibit antifungal activity (Díaz-Cárdenas et al., 2017; S. N. Kumar et al., 2014; Stoianova et al., 2012), while 9-octadecenoic acid is associated with antimicrobial activity (Dong et al., 2008). Diketopiperazines are likely produced under these conditions as signalling molecules to modulate bacterial communication and protect against other microorganisms (Mishra et al., 2017).

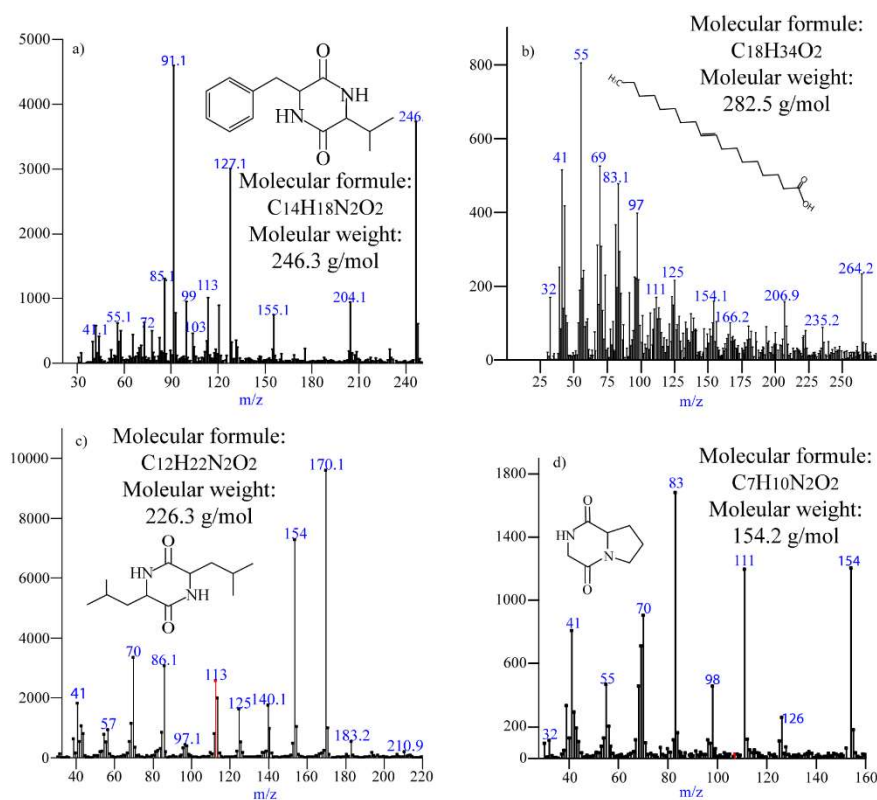


Fig. 9.7 Chemical structures and mass spectra of identified antifungal compounds: ciclo (Val-Phe) (a), 9 octadecenoic acid (b), ciclo (Leu-Leu) (c) and ciclo (Pro-Gly) (d).

## 9.5 Discussion

### 9.5.1 Consumption of polyols and their effect on antifungal activity

According to the results, mannitol and sorbitol were likely assimilated through their conversion to fructose-6P (Nissen et al., 2005; Wisselink et al., 2002). The composition of the culture medium affects the induction of antifungal compound production in LAB cultures (Dalié et al., 2010), indicating that the addition of polyols to the MRS broth leads to the production of antimicrobial compounds. The uptake of xylitol and glycerol was negligible (Fig. 9.2); whereas, the presence of these polyols increased the antifungal activity of *L.*

*plantarum* MZ809351 (31). This result agrees with a previous study (Lipińska et al., 2016) where xylitol was added to MRS broth, suggesting that in the presence of polyols, the bacterial metabolism is directed towards the synthesis of antifungal compounds.

### 9.5.2 OTA production by *A. carbonarius*

Our results are partially in agreement with previous studies that reported that *Aspergillus carbonarius* Ac. 162 can produce 37 µg/g agar (Djossou, Perraud-gaime, et al., 2011), a concentration that depends on experimental conditions since mycotoxin production could be affected by environmental factors (Adeyeye, 2016). The best results of this work show an OTA production 23.6% lower than that reported in the literature (Djossou, Perraud-Gaime, et al., 2011).

The conditions for obtaining the best OTA reduction and the best inhibition of fungal growth did not coincide. A compromise was made between these criteria, and it is explained as follows. Regarding the tests with the CCF of *L. plantarum* MZ809351, the addition of xylitol and glycerol presented the most significant inhibition in the growth of *Aspergillus carbonarius* (85.7-86.7%, Fig. 8.1) and a significant reduction in OTA production (56.8 and 54.7%, Fig. 8.3, respectively). The addition of sorbitol did not show a significant reduction (Fig. 9.1) on growth inhibition ( $52\pm 15\%$ ), but it reduced OTA production (67.7%, Fig. 9.3). In the case of the *L. plantarum* MZ809351 strain, the presence of mannitol favoured the production of OTA (Fig. 9.3), perhaps due to the consumption of this polyol (Fig. 9.2), which is biotransformed to fructose-6-P and metabolized via the Embden-Meyerhof-Parnas route; some byproducts of this route that could stimulate OTA production (Bhatt et al., 2013).

### 9.5.3 Synergistic effect of antifungal compounds

The results from Fig. 9.4 showed differences in sporulation patterns, probably due to the other metabolites produced during *L. plantarum* MZ809351 cultivation, suggesting that in addition to cyclic dipeptides, other compounds could act synergistically to cause fungal inhibition (Li et al., 2012), which was the case for the sorbitol treatment. No difference was found in the GC-MS spectra compared with the control of the sterilized MRS medium

without fermentation (data not shown). Since the separation technique was designed for the extraction of cyclic dipeptides (Stamatelopoulou et al., 2018), this was experimental confirmation that eluate 1 is a negative control with no antifungal activity caused by cyclic dipeptides. The other metabolites can be identified using other separation methods coupled with subsequent GC–MS analysis. A synergistic effect was also observed in Fig. 9.5, wherein 15 µL tests with xylitol and glycerol added to the culture medium showed 4% and 18% fungal inhibition, respectively. In comparison, the CCFs of these same treatments produced 85.7-86.7% (Fig. 9.1) fungal inhibition, suggesting a synergistic effect between the identified compounds in the concentrated samples and other compounds present in the culture medium (Li et al., 2012).

## 9.6 Conclusion

The supplementation of MRS broth with polyols increases the antifungal activity of *L. plantarum* MZ809351 (31). Glycerol and xylitol are not assimilated as carbon sources under the conditions used in this study. Sorbitol and mannitol were consumed during LAB cultivation but did not significantly inhibit the growth of *A. carbonarius* Ac 162, a fungal ochratoxigenic compound producer. The conditions that showed the best compromise between the greatest inhibition of fungal growth and the most significant decrease in OTA production contained the CCFs of *L. plantarum* MZ809351 with xylitol and glycerol. Under these conditions, the highest inhibition of fungal growth was obtained (85.7-86.7%, respectively), and a significant reduction in OTA production was observed (56.8 and 54.7%, respectively). In addition to 9-octadecenoic acid, 3 diketopiperazines or cyclic dipeptides were identified, including cyclo (Leu-Leu), cyclo (Pro- Gly) and cyclo (Val-Phe), which were compounds related to microbial antifungal activities. Xylitol and glycerol induced the production of these antifungal compounds against *A. carbonarius* xAc 162. The results of this study show the potential application of *L. plantarum* MZ809351 fermentation metabolites as biocontrol agents and provide an alternative technique to prevent the growth of mycotoxigenic fungi, such as *A. carbonarius*, in foods.

## 10. Conclusión general

Las cepas provenientes de Costa de Marfil produjeron ácido láctico, propiónico y etanol. La cepa 31 también produjo ácido butírico y se obtuvo una mayor respuesta cuando se cultiva en anaerobiosis. Se demostró que además de los ácidos orgánicos se produjeron otros compuestos con actividad antifúngica puesto que los SLC tienen actividad antifúngica aun cuando el pH se ajusta por encima del valor de pKa de los ácidos orgánicos.

Uno de las aportaciones más significativas que se encontraron fue que la fuente de nitrógeno se encuentra en exceso, por lo tanto, podría ser reducida la cantidad de extracto de levadura a la mitad en la formulación (2.5 g/L) sin afectar el crecimiento y la actividad antifúngica de las BAL 7 y 31 y de esta manera se reducirían considerablemente los costos del uso de BAL como agentes de control biológico.

También se demostró que los iones  $\text{Ca}^{++}$  pueden tener un efecto antagonista con otros metales que participan en la producción de metabolitos con actividad antifúngica. Mientras que la adición de NaCl parece indicar que los iones  $\text{Na}^+$  no participan en la producción de compuestos antimicrobianos por las BAL 7 y 31.

De acuerdo con la hipótesis planteada en esta tesis, es posible afirmar la idea de que la modificación del medio de cultivo MRS con la adición de polioles tiene un efecto inductivo la producción de compuestos antifúngicos.

La presente tesis ha permitido demostrar que los compuestos antifúngicos producidos, pueden presentar dos tipos de comportamiento: los que ejercen inhibición del crecimiento y de producción de OTA, y los que inhiben el crecimiento pero que estimulan la producción de OTA.

Este trabajo de tesis aportó información acerca de los metabolitos con actividad antifúngica producidos por BAL, se determinaron algunos factores que inducen su biosíntesis. Se lograron identificar tres dicetopiperazinas: ciclo (Leu-Leu), ciclo (Val-Phe) y ciclo (Pro-Gly). así como ácido 9-octadecenoico cuando es adicionado xilitol y glicerol al medio de cultivo MRS.

Este trabajo presenta el potencial de aplicación de las bacterias lácticas como agentes de control biológico de los hongos ocratoxigénicos en alimentos.



## 11. Referencias

- Adeyeye, S. A. O. (2016). Fungal mycotoxins in foods: A review. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1). <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1213127>
- Aguilar-Alvarez, M. E., Saucedo-Castañeda, G., Durand, N., Perraud-Gaime, I., González-Robles, R. O., & Rodríguez-Serrano, G. M. (2021). The variety, roasting, processing, and type of cultivation determine the low OTA levels of commercialized coffee in Chiapas State, Mexico. *Food Control*, 126, 108088.
- Aksoy, M. A., & Beghin, J. C. (Eds.). (2004). Global agricultural trade and developing countries. *World Bank Publications*
- Amador, H. J. U., Lechuga, R. L., Guerrero, A. R., Perraud, I. G., Serrano, G. R., & Castañeda, G. S. (2018). Análisis de las interacciones fisicoquímicas y ecológicas en los mecanismos de antagonismo entre hongos ocratoxigénicos presentes en cerezas de café y bacterias ácido lácticas. Universidad Autónoma metropolitana
- Amézqueta, S., Schorr-Galindo, S., Murillo-Arbizu, M., González-Peñas, E., López de Cerain, A., & Guiraud, J. P. (2012). OTA-producing fungi in foodstuffs: A review. *Food Control*, 26(2), 259–268. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.042>
- Amit, S. K., Uddin, M. M., Rahman, R., Islam, S. M. R., & Khan, M. S. (2017). A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agriculture and Food Security*, 6(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s40066-017-0130-8>
- Axelsson, L. T., Chung, T. C., Dobrogosz, W. J., & Lindgren, S. E. (1989). Production of a broad spectrum antimicrobial substance by lactobacillus reuteri. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2(2), 131–136. <https://doi.org/10.3109/08910608909140210>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barberis, S., Quiroga, H. G., Barcia, C., Talia, J. M., & Debattista, N. (2018). Natural Food Preservatives Against Microorganisms. In *Food Safety and Preservation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814956-0.00020-2>
- Barkai-Golan, R. (2008). *Penicillium* Mycotoxins. *Mycotoxins in Fruits and Vegetables*, 153–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374126-4.00007-3>
- Bennett, J. W. (1992). *Aspergillus*: biology and industrial applications. *Biotechnology*
- Bhatt, S. M., Mohan, A., & Srivastava, S. K. (2013). Challenges in Enzymatic Route of Mannitol Production. *ISRN Biotechnology*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.5402/2013/914187>
- Bianchini, A. (2015). Lactic acid bacteria as antifungal agents. In *Advances in Fermented Foods and Beverages: Improving Quality, Technologies and Health Benefits*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-015-6.00014-1>
- Bianchini, A., & Bullerman, L. B. (2014). Mycotoxins: Classification. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 2, 854–861. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00230-5>



- Böhme, K., Fernández-No, I. C., Barros-Velázquez, J., Gallardo, J. M., Cañas, B., & Calo-Mata, P. (2011). Rapid species identification of seafood spoilage and pathogenic Gram-positive bacteria by MALDI-TOF mass fingerprinting. *Electrophoresis*, 32(21), 2951–2965. <https://doi.org/10.1002/elps.201100217>
- Bottalico, A., & Perrone, G. (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 108(7), 611–624. <https://doi.org/10.1023/A:1020635214971>
- Cabo, M. L., Braber, A. F., & Koenraad, P. M. F. J. (2002). Apparent antifungal activity of several lactic acid bacteria against *Penicillium discolor* is due to acetic acid in the medium. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1309–1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>
- Champagne, C. P., Gaudreau, H., Conway, J., Chartier, N., & Fonchy, E. (1999). Evaluation of yeast extracts as growth media supplements for *Lactococci* and *Lactobacilli* by using automated spectrophotometry. *Journal of General and Applied Microbiology*, 45(1), 17–21. <https://doi.org/10.2323/jgam.45.17>
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Letters*, 46(3), 269–280. [https://doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90112-1](https://doi.org/10.1016/0378-1097(87)90112-1)
- Corsetti, A., Gobetti, M., Rossi, J., & Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50(2), 253–256. <https://doi.org/10.1007/s002530051285>
- Crowley, S., Mahony, J., & van Sinderen, D. (2013). Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiologica*, 58(4), 291–299. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0209-3>
- da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., & Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 166(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026>
- Dagnas, S. P., & Membre, J. M. (2013). Predicting and preventing mold spoilage of food products. *Journal of Food Protection*, 76(3), 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21(4), 370–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- Dallagnol, A. M., Catalan, C. A. N., M.I., M., Font, de V., & Rollan, G. C. (2011). Effect of biosynthetic intermediates and citrate on the phenyllactic and hydroxyphenyllactic acids production by *Lactobacillus plantarum* CRL 778. 1447–1455. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05159.x>
- De Muynck, C., Leroy, A. I. J., De Maeseneire, S., Arnaut, F., Soetaert, W., & Vandamme, E. J. (2004). Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites. *Microbiological Research*, 159(4), 339–346. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.07.002>
- Diano, A., Bekker-Jensen, S., Dynesen, J., & Nielsen, J. (2007). Butanol production from agricultural residues : impact of degradation products on *Clostridium beijerinckii* growth and butanol Fermentation. *Bioresource and Bioengineering*, 97(6), 1460–1469.

<https://doi.org/10.1002/bit>

- Díaz-Cárdenas, C., Cantillo, A., Rojas, L. Y., Sandoval, T., Fiorentino, S., Robles, J., Ramos, F. A., Zambrano, M. M., & Baena, S. (2017). Microbial diversity of saline environments: searching for cytotoxic activities. *AMB Express*, 7(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-017-0527-6>
- Djadouni, F., & Kihal, M. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria and the spectrum of their biopeptides against spoiling germs in foods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 55(3), 435–444. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132012000300015>
- Djossou, O., Perraud-gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A., & Roussos, S. (2011). Anaerobe Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe*, 17(6), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.006>
- Dong, Q. F., Wang, J. L., Zhang, S. F., Wang, Z., Zhang, C. X., Gao, H., Zhang, H. M., & Zhang, L. (2008). Antifungal activity of crude extracts and fat-soluble constituents of *Holotrichia diomphalia* larvae. *Bioresource Technology*, 99(17), 8521–8523. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.010>
- Dukare, A. S., Paul, S., Nambi, V. E., Gupta, R. K., Singh, R., Sharma, K., & Vishwakarma, R. K. (2019). Exploitation of microbial antagonists for the control of postharvest diseases of fruits: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(9), 1498–1513. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1417235>
- Durand, N. (2012). Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes. Université Montpellier II.
- El Khoury, A. E., & Atoui, A. (2010). Ochratoxin a: General overview and actual molecular status. *Toxins*, 2(4), 461–493. <https://doi.org/10.3390/toxins2040461>
- Elms, R. (2019). Mexico Coffee Annual Mexican Coffee Production Continues to Rebound From Coffee Rust Disease.
- Eskola, M., Kos, G., Elliott, C. T., Hajšlová, J., Mayar, S., & Krska, R. (2019). Worldwide contamination of food-crops with mycotoxins: Validity of the widely cited ‘FAO estimate of 25%. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59, 1–17. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1658570>
- Farkas, J. (2007). Physical Methods of Food Preservation. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. <https://doi.org/10.1128/9781555818463.ch29>
- Flickinger, M. C., & Panikov, N. S. (2010). Kinetics, Microbial Growth. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1002/9780470054581.eib378>
- Freire, C. De, Coutinho, B. G., Lívio, M., & Coelho, V. (2010). Lysostaphin: A *Staphylococcal* Bacteriolysin with Potential Clinical Applications. *Pharmaceuticals*, 3, 1139–1161. <https://doi.org/10.3390/ph3041139>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2(Figure 2), 106–117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Gerez, C. L., Torres, M. J., Font de Valdez, G., & Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64(3), 231–237. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2012.10.009>

- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage - Interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7)
- Gutierrez, G. A. D., Perraud, I. G., Castañeda, G. S., & Serrano, G. R. (2019). Diseño de un medio de cultivo de bajo costo para la optimización del crecimiento de bacterias ácido lácticas como control biológico de la producción de ocratoxina A. Universidad Autónoma Metropolitana
- Gutierrez, R. E.K., Rodríguez, G. S., (2019). Caracterización de comunidades microbianas asociadas a cerezas frescas y secas de café de la región de Tabasco mediante métodos dependientes e independientes del cultivo. Universidad Autónoma Metropolitana
- Hayek, S. A., & Ibrahim, S. A. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 2013, 73–87. [http://file.scirp.org/Html/10-2700895\\_40133.htm](http://file.scirp.org/Html/10-2700895_40133.htm)
- Hébert, E. M., Raya, R. R., & Savoy de Giori, G. (2009). Evaluation of Minimal Nutritional Requirements of Lactic Acid Bacteria Used in Functional Foods. *Environmental Microbiology*, 3, 139–148. <https://doi.org/10.1385/1-59259-765-3:139>
- Helander, I., von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146-150.
- Heussner, A. H., & Bingle, L. E. H. (2015). Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data. *Toxins*, 7(10), 4253–4282. <https://doi.org/10.3390/toxins7104253>
- Hodgson, D. A. (2000). Primary metabolism and its control in Streptomycetes: A most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, 42, 47–238. [https://doi.org/10.1016/s0065-2911\(00\)42003-5](https://doi.org/10.1016/s0065-2911(00)42003-5)
- Hope, J. H., & Hope, B. E. (2012). A review of the diagnosis and treatment of ochratoxin a inhalational exposure associated with human illness and kidney disease including focal segmental glomerulosclerosis. *Journal of Environmental and Public Health*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/835059>
- Hujanen, M., & Linko, Y. Y. (1994). Optimization of L(+)-lactic acid production employing statistical experimental design. *Biotechnology Techniques*, 8(5), 325–330. <https://doi.org/10.1007/BF02428975>
- Keblys, M., Bernhoft, A., Höfer, C. C., Morrison, E., Larsen, H. J. S., & Flåøyen, A. (2004). The effects of the *Penicillium* mycotoxins citrinin, cyclopiazonic acid, ochratoxin A, patulin, penicillic acid, and roquefortine C on in vitro proliferation of porcine lymphocytes. *Mycopathologia*, 158(3), 317–324. <https://doi.org/10.1007/s11046-005-5523-8>
- Kharazian, Z. A., Salehi Jouzani, G., Aghdasi, M., Khorvash, M., Zamani, M., & Mohammadzadeh, H. (2017). Biocontrol potential of *Lactobacillus* strains isolated from corn silages against some plant pathogenic fungi. *Biological Control*, 110, 33–43. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.004>
- Kleerebezem, M., & Quadri, L. (2001). Peptide pheromone-dependent regulation of antimicrobial peptide production in Gram-positive bacteria: a case of multicellular behavior. *Peptides*, 22(10), 1579–1596. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.08.033>
- Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in Microbiology*,

7(JAN), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02170>

- Kumar, S. N., Nambisan, B., Sundaresan, A., Mohandas, C., & Anto, R. J. (2014). Isolation and identification of antimicrobial secondary metabolites from *Bacillus cereus* associated with a rhabditid entomopathogenic nematode. *Annals of Microbiology*, *64*(1), 209–218. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0653-6>
- Kumar, Singh, N., Jaryal, R., Bhandari, C., Singh, J., Thakur, P., & Duhan, A. (2019). Purification, characterization and antibacterial spectrum of a compound produced by *Bacillus cereus* MTCC 10072. *Archives of Microbiology*, *201*(9), 1195–1205. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01685-1>
- Kwak, M. K., Liu, R., Kwon, J. O., Kim, M. K., Kim, A. H. J., & Kang, S. O. (2013). Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the influenza A virus. *Journal of Microbiology*, *51*(6), 836–843. <https://doi.org/10.1007/s12275-013-3521-y>
- Lee, H., Churey, J. J., & Worobo, R. W. (2008). Purification and structural characterization of bacillomycin F produced by a bacterial honey isolate active against *Byssoschlamys fulva* H25. *Journal of Applied Microbiology*, *105*(3), 663–673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03797.x>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms*, *5*(3), 37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Li, H., Liu, L., Zhang, S., Cui, W., & Lv, J. (2012). Identification of antifungal compounds produced by *Lactobacillus casei* AST18. *Current Microbiology*, *65*(2), 156–161. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0135-2>
- Lind, H., Sjögren, J., Gohil, S., Kenne, L., Schnürer, J., & Broberg, A. (2007). Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS Microbiology Letters*, *271*(2), 310–315. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00730.x>
- Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., & Nowak, A. (2016). Antifungal activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the presence of xylitol and galactosyl-xylitol. *BioMed Research International*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/5897486>
- Majumdar, A., Pradhan, N., Sadasivan, J., & Acharya, A. (2018). Diseases : A Microbial Approach. *Microbial Contamination and Food Degradation*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2/00005-6>
- Makovitzki, A., & Shai, Y. (2005). pH-dependent antifungal lipopeptides and their plausible mode of action. *Biochemistry*, *44*(28), 9775–9784. <https://doi.org/10.1021/bi0502386>
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. *Toxins*, *8*(7), 191.
- Marin, S., Ramos, A. J., Cano-Sancho, G., & Sanchis, V. (2013). Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food and Chemical Toxicology*, *60*, 218–237. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.07.047>
- Martins, M. B., & Carvalho, I. (2007). Diketopiperazines: biological activity and synthesis. *Tetrahedron*, *63*(40), 9923–9932. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2007.04.105>
- Matevosyan, L., Bazukyan, I., & Trchounian, A. (2019). Comparative analysis of the effect of Ca and Mg ions on antibacterial activity of lactic acid bacteria isolates and their associations

depending on cultivation conditions. *AMB Express*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-019-0758-9>

- Mbundi, L., Gallar-Ayala, H., Khan, M. R., Barber, J. L., Losada, S., & Busquets, R. (2014). Advances in the analysis of challenging food contaminants: Nanoparticles, bisphenols, mycotoxins, and brominated flame retardants. In *Advances in Molecular Toxicology*, 1(8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63406-1.00002-7>
- Microbiol, C., Toplaghaltsyan, A., Bazukyan, I., & Trchounian, A. (2016). The Effects of Different Carbon Sources on the Antifungal Activity by Lactic Acid Bacteria. *Current Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-1168-8>
- Mishra, A. K., Choi, J., Choi, S. J., & Baek, K. H. (2017). Cyclodipeptides: An overview of their biosynthesis and biological activity. *Molecules*, 22(10), 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules22101796>
- Mitchell, D. A., Meien, O. F. Von, Krieger, N., Diba, F., & Dalsenter, H. (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 17(1), 15–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)
- Mortera, P., Pudlik, A., Magni, C., Alarcón, S., & Lolkema, J. S. (2013). Ca<sup>2+</sup> -citrate uptake and metabolism in *Lactobacillus casei* atcc 334. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4603–4612. <https://doi.org/10.1128/AEM.00925-13>
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food mycotoxins: An update. *Journal of Food Science*, 71(5), 51–65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>
- Niel, E. W. J. Van, & Hofvendahl, K. (2002). Formation and Conversion of Oxygen Metabolites by. *Microbiology*, 68(9), 4350–4356. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4350>
- Nissen, L., Pérez-Martínez, G., & Yebra, M. J. (2005). Sorbitol synthesis by an engineered *Lactobacillus casei* strain expressing a sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene within the lactose operon. *FEMS Microbiology Letters*, 249(1), 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.06.010>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Ogunade, I. M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O. C. M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., & Adesogan, A. T. (2018). Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation. *Journal of Dairy Science*, 101(5), 4034–4059. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13788>
- Oueslati, S., Meca, G., Mliki, A., Ghorbel, A., & Mañes, J. (2011). Determination of *Fusarium* mycotoxins enniatins, beauvericin and fusaproliferin in cereals and derived products from Tunisia. *Food Control*, 22(8), 1373–1377. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.02.015>
- Özogul, F., & Hamed, I. (2018). The importance of lactic acid bacteria for the prevention of bacterial growth and their biogenic amines formation: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(10), 1660–1670. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1277972>
- P. de Carvalho, M., & Abraham, W.-R. (2012). Antimicrobial and Biofilm Inhibiting Diketopiperazines. *Current Medicinal Chemistry*, 19(21), 3564–3577.

<https://doi.org/10.2174/092986712801323243>

- Parveen, S., Wani, A. H., Bhat, M. Y., & Koka, J. A. (2016). Biological control of postharvest fungal rots of rosaceous fruits using microbial antagonists and plant extracts - a review. *Czech Mycology*, 68(1), 41–66. <https://doi.org/10.33585/cmy.68102>
- Pitt, J. I. (2000). Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*, 38(s1), 17–22. <https://doi.org/10.1080/mmy.38.s1.17.22>
- Posthuma, C. C., Bader, R., Engelmann, R., Postma, P. W., Hengstenberg, W., & Pouwels, P. H. (2002). Expression of the Xylulose 5-Phosphate Phosphoketolase Gene. *Microbiology*, 68(2), 831–837. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.2.831>
- Rahman, M. S. (2009). Food stability beyond water activity and glass transition: Macro-micro region concept in the state diagram. *International Journal of Food Properties*, 12(4), 726–740. <https://doi.org/10.1080/10942910802628107>
- Rawat, S. (2015). Food Spoilage: Microorganisms and their prevention. *Pelagia Research Library Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(4), 47–56. [www.pelagiaresearchlibrary.com](http://www.pelagiaresearchlibrary.com)
- Reginensi, S. M., Olivera, J. A., Bermúdez, J., & González, M. J. (2016). Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability. *Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability*. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2555-6>
- Reis, J. A., Paula, A. T., Casarotti, S. N., & Penna, A. L. B. (2012). Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. *Food Engineering Reviews*, 4(2), 124–140. <https://doi.org/10.1007/s12393-012-9051-2>
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., & Kok, J. (2002). Pediocin PA-1 , a Wide-Spectrum Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(2), 91–121. <https://doi.org/10.1080/10408690290825475>
- Satpute, S. K., Kulkarni, G. R., Banpurkar, A. G., Banat, I. M., Mone, N. S., Patil, R. H., & Cameotra, S. S. (2016). Biosurfactant/s from *Lactobacilli* species: Properties, challenges and potential biomedical applications. *Journal of Basic Microbiology*, 56(11), 1140–1158. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600143>
- Sharma, S. (2015). Food Preservatives and their harmful effect. *International Journal of Scientific and Research Publications*, 5(4), 5–6. [www.ijsrp.org](http://www.ijsrp.org)
- Shyam, R., Kumar, R., Prof, K., Jain, S., Gupta, A. K., Verma, A., & Agnihotri, P. (2020). Innovative Research on Science , Humanities , *Engineering & Management*
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138–146. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>
- Singh, V. P. (2018). Recent approaches in food bio-preservation-A review. *Open Veterinary Journal*, 8(1), 104–111. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.16>
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018). Fungal spoilage in food processing. *Journal of Food Protection*, 81(6), 1035–1040. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-031>
- Stamatelopoulou, E., Agriopoulou, S., Dourtoglou, E., Chatzilazarou, A., Drosou, F., Marinea, M., & Dourtoglou, V. (2018). Diketopiperazines in wines. *Journal of Wine Research*, 29(1), 37–48. <https://doi.org/10.1080/09571264.2018.1433137>

- Stoianova, L. G., Ustiugova, E. A., & Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiya*, *48*(3), 259–275. <https://doi.org/10.1134/S0003683812030143>
- Su, Y. K., Willis, L. B., & Jeffries, T. W. (2015). Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*, *112*(3), 457–469. <https://doi.org/10.1002/bit.25445>
- Sueck, F., Specht, J., Cramer, B., & Humpf, H. U. (2020). Identification of ochratoxin-N-acetyl-L-cysteine as a new ochratoxin A metabolite and potential biomarker in human urine. *Mycotoxin Research*, *36*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s12550-019-00360-0>
- Taniwaki, M. H., Pitt, J. I., & Magan, N. (2018). *Aspergillus* species and mycotoxins: occurrence and importance in major food commodities. *Current Opinion in Food Science*, *23*, 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2005). Characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from spoiled black olives. *Journal of Basic Microbiology*, *45*(4), 312–322. <https://doi.org/10.1002/jobm.200410532>
- Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S. D., & Maguin, E. (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, *82*(1–4), 187–216. <https://doi.org/10.1023/A:1020631532202>
- Verpoorte R. (2000). Secondary metabolism. Dordrecht. *Metabolic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, 1–29.
- Wisselink, H. W., Weusthuis, R. A., Eggink, G., Hugenholtz, J., & Grobber, G. J. (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: A review. *International Dairy Journal*, *12*(2–3), 151–161. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(01\)00153-4](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00153-4)
- Wu, L., Wu, H. J., Qiao, J., Gao, X., & Borriss, R. (2015). Novel routes for improving biocontrol activity of *Bacillus* based bioinoculants. *Frontiers in Microbiology*, *6*(DEC), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01395>
- Yang, E. J., Kim, Y. S., & Chang, H. C. (2011). Purification and characterization of antifungal  $\delta$ -dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Journal of Food Protection*, *74*(4), 651–657. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-512>
- Zain, M. E. (2011). Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*, *15*(2), 129–144. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2010.06.006>
- Zaunmüller, T., Eichert, M., Richter, H., & Uden, G. (2006). Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *72*(3), 421–429. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0514-3>
- Zhao, H., Vegi, A., & Wolf-Hall, C. (2017). Screening of lactic acid bacteria for anti-*Fusarium* activity and optimization of incubation conditions. *Journal of Food Protection*, *80*(10), 1648–1656. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-100>

## 12 Anexos

### Medios de cultivo para hongos

Tabla A1. Composición del medio CYA

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
	<b>(g/L)</b>
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
Extracto de levadura	5
Sacarosa	30
Agar bacteriológico	8
Medio Czapek	10 mL

Tabla A2. Composición del medio Czapeck

<b>Compuesto</b>	<b>Concentración</b>
	<b>(g/L)</b>
KCl	5
NaNO <sub>3</sub>	20
Sulfato ferroso	0.1
Sulfato de magnesio	5



## Curvas patrón de crecimiento de BAL

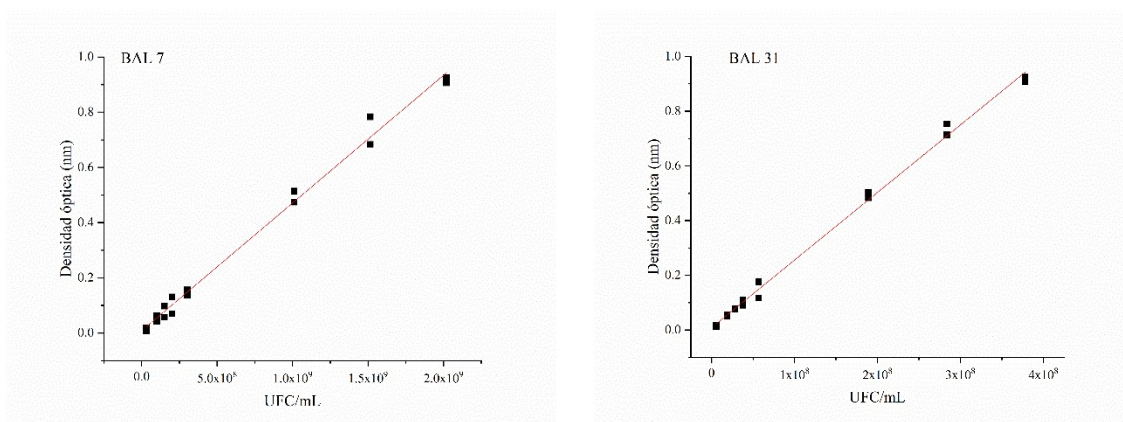


Figura A1. Curvas de crecimiento de las BAL 7 y 31 de densidad óptica vs UFC/mL

Tabla A3. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de densidad óptica vs UFC/mL para las BAL 7 y 31.

BAL	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>
7	0.0083	$5 \times 10^{-10}$	0.998
31	$8.3 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-9}$	0.997

## Curvas patrón para la cuantificación de polioles

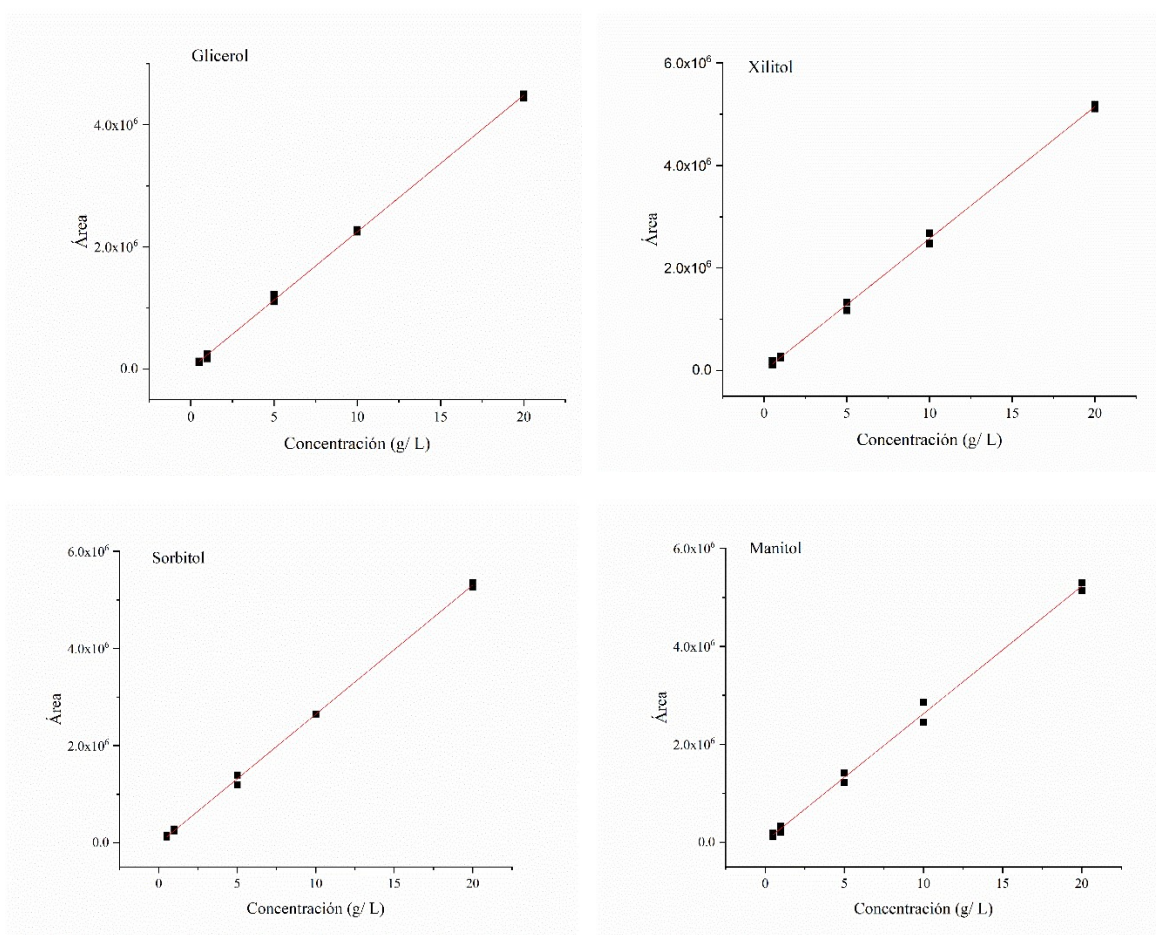


Figura A2. Curvas de calibración generadas para la cuantificación de polioles.

Tabla A4. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de concentración vs área para la cuantificación de polioles.

Poliol	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>
Glicerol	2579	223780	0.999
Xilitol	-4696	257574	0.999
Sorbitol	-19127	268082	0.999
Manitol	19398	260442	0.999

## Curvas patrón para la cuantificación de compuestos producidos por BAL

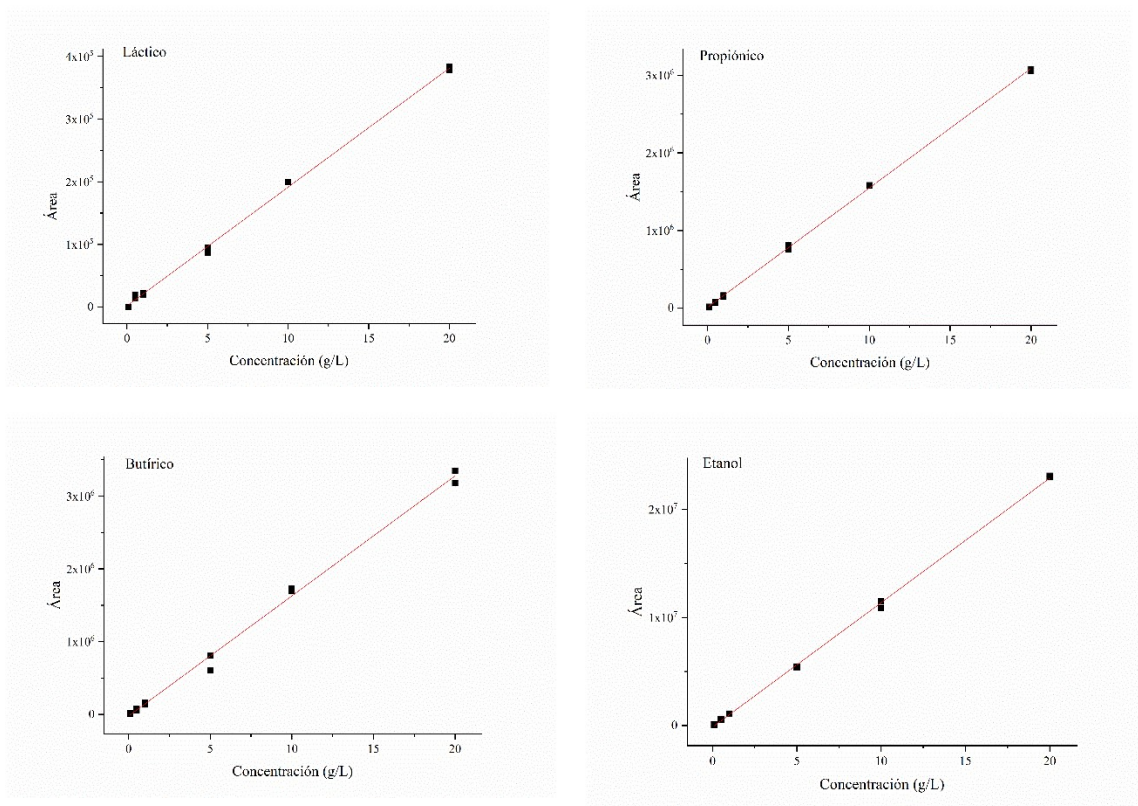


Figura A3. Curvas de calibración generadas para la cuantificación de ácidos orgánicos y etanol.

Tabla A5. Parámetros obtenidos del ajuste lineal de concentración vs área para la cuantificación de metabolitos producidos por BAL.

Alcohol	Intercepto	Pendiente	R <sup>2</sup>
Láctico	133.60	161076	0.999
Propiónico	9217	153814	0.999
Butírico	-22495	164972	0.998
Etanol	-136941	$1.15 \times 10^6$	0.999

## Secuenciación de bacterias ácido lácticas

<i>Lactobacillus plantarum</i> MZ801739	(J)	Aislada en Costa de Marfil.
<i>Lactobacillus plantarum</i> MN982928	(3)	Aislada en México
<i>Leuconostoc citreum</i> MZ801735	(23)	Aislada en México.
<i>Lactobacillus plantarum</i> MZ809351	(31)	Aislada en Costa de Marfil.
<i>Lactobacillus plantarum</i> MZ809350	(34)	Aislada en Costa de Marfil.

J, 3, 23, 31 y 34 son los códigos internos del laboratorio.

*Lactobacillus plantarum* MZ801739 (J)

CGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGT  
GCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGCGGAACTGGTGAGTAACACGTGG  
GAAACCTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGC  
ATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT  
TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAATGGCTCACCATGG  
CAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACA  
CGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAA  
AGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAAC  
CTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTATT  
TAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
GGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTA  
AGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA  
AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAACCTGAC  
GCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGCATA  
CCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGC  
TAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAA  
GGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCT  
ACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGA  
CGTTCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT  
CGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCC  
AGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGT  
GGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTAC  
AATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAG  
CCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGC  
TAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACAC  
ACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCT  
TTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTACAA  
GGTACCGGGTCATA

*Lactobacillus plantarum* MN982928 (3)

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTG  
GTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGT  
GGGAAACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACC  
GCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCA  
CTTTTGGATGGTCCC GCGGCGTATTAGCTAGATGGTGRGGTAACGGCTCACCAT  
GGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGA  
CACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACG  
AAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAA  
CTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTTCAGGTATTGACGGTA  
TTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG  
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTT  
AAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGG  
AAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCG  
TAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTGA  
CGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGGTC  
CATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTG  
CAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACT  
CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCTGA  
AGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGAT  
TAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATAACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTC  
GTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGT  
TGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
AGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT  
GCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCT  
TAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA  
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT  
ACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTA  
ACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGT  
ACAAGGTAACCGGGTC

*Leuconostoc citreum* MZ801735 (23)

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGCGCAGCGAGAGGTGCTT  
GCACCTTTCAAGCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTGCCTC  
AAGGCTGGGGATAACATTTGGAAACAGATGCTAATACCGAATAAACTTAGTA  
TCGCATGATATCAAGTTAAAAGGCGCTACGGCGTCACCTAGAGATGGATCCGC  
GGTGCATTAGTTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTTACCAAGACGATGATGCATAGC  
CGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCT  
ACGGGAGGCTGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGGCGCAAGCCTGATGGAGCA  
ACGCCGCGTGTGTGATGAAGGCTTTTCGGGTTCGTAAAGCACTGTTGTATGGGAA  
GAAATGCTAAAATAGGGAATGATTTTAGTTTGACGGTACCATAACCAGAAAGG  
ACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTATGTCCCGAGCGTTATC  
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTGATTAAGTCTGATGTGAA  
AGCCCGGAGCTCAACTCCGGAATGGCATTGGAACTGGTTAACTTGAGTGTTG  
TAGAGGTAAGTGGAACCTCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAG  
AACACCAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACAACAACCTGACGTTGAGGCTCGAA  
AGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGGTCACACCGTAAACGAT  
GAATACTAGGTGTTAGGAGGTTTCCGCCTCTTAGTGCCGAAGCTAACGCATTAA  
GTATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGG  
GGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAAC  
CTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGAAGCTTTTAGAGATAGAAGTGTTCTCTTCG  
GAGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGT  
TGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGTTAGTTGCCAGCATTCACT  
TGGGCACTCTAGCGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGCGGGGACGAC  
GTCAGATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGTA  
TACAACGAGTTGCCAACCTGCGAAGGTGAGCTAATCTCTTAAAGTACGTCTCA  
GTTTCGGACTGCAGTCTGCAACTCGACTGCACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC  
GCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACCGCCCG  
TCACACCATGGGAGTTTGTAAATGCCCAAAGCCGGTGGCCTAACCTTCGGGAGG  
GAGCCGTCTAAGGCAGGACAGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACC  
GGGTCATA

*Lactobacillus plantarum* MZ809351 (31)

GCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTG  
CATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAA  
CCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAC  
AACTTGGACCGCATGGTCCGAGYTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGA  
TGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAATGGCTCACCATGGCAATG  
ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCC  
CAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCT  
GATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTT  
GTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAAGGTATTGACGGTATTTAAC  
CAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCA  
AGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTT  
GAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA  
TATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGA  
GGCTCGAAAGTATGGGTAGCAACAGGATTAGATACCCTGGTAGGTCTACCGTA  
AACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGTGCAGCTAACG  
CATTAAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAAT  
TGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCG  
AAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCC  
CTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAG  
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT  
AAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT  
GACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA  
TGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCT  
CAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAAT  
CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCC  
GTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGA  
ACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAAC  
CGGGTCATA

*Lactobacillus plantarum* MZ809350 (34)

ACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGATTGGTGC  
TTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAAC  
CTGCCAGAAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAATT  
GGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCG  
CGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAATGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCG  
ACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGGG  
AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCG  
TGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAG  
AGTAACTGTTCAAGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCC  
AGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAG  
CGAGCGCAGGCGGTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGT  
GCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAG  
CGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCCGGCTGTCTGGTC  
TGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGT  
AGGTCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCT  
GCAGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCA  
AAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCTA  
CGCGAAGAACCCTACCAGGTCTTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCC  
CTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGAT  
GTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTT  
GGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA  
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACG  
AGTTGCGAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTA  
GGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCC  
GCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGT  
AACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTAAGGTGGGACAG  
ATGATTAGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAACCGGGTCATA



## Publicaciones y presentaciones en congresos

Espinosa Salgado R., Román Guerrero A., Gaimé-Perraud I., Rodríguez Serrano G. M., Saucedo Castañeda G. (2018) Actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas en presencia de polioles XXXIX encuentro nacional de la asociación mexicana de ingeniería química. San José del Cabo, México (oral).

Espinosa Salgado R., Solares Ávila K., Gaimé-Perraud I., Rodríguez Serrano G. M., Saucedo Castañeda G. (2019) Análisis de la variación de la fuente de nitrógeno en el cultivo de bacterias ácido lácticas sobre la inhibición del crecimiento de *Aspergillus Carbonarius* XL encuentro nacional de la asociación mexicana de ingeniería química. Huatulco, México, (cartel)

Espinosa Salgado R., Gaimé-Perraud I., Rodríguez Serrano G. M., Saucedo Castañeda G. (2020) Efecto de la adición de polioles al cultivo de *Lactobacillus plantarum* sobre el crecimiento y actividad antifúngica contra *Aspergillus Carbonarius* XLI encuentro nacional de la asociación mexicana de ingeniería química. México (Modalidad cartel virtual).

## Artículo

Rubén Espinosa-Salgado R., Tamayo-Galván V., Perraud-Gaimé I., Rodríguez-Serrano G. M., González-Robles R. O., Durand N., Champion-Martínez E. I., Saucedo-Castañeda G. (2022) Polyols induce the production of antifungal compounds by *Lactobacillus plantarum*. *Current Microbiology*

# ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS EN PRESENCIA DE POLIOLES

Rubén Espinosa Salgado<sup>a</sup>, Angélica Román Guerrero<sup>a</sup>, Isabelle Gaime-Perraud<sup>b</sup>,  
Gabriela M. Rodríguez Serrano<sup>a</sup>, Gerardo Saucedo Castañeda<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,

<sup>b</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia.

[esru88@gmail.com](mailto:esru88@gmail.com), [saucedo@xanum.uam.mx](mailto:saucedo@xanum.uam.mx)

## Resumen

Este trabajo tuvo como finalidad evaluar la capacidad antifúngica de 4 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) al adicionar polioles (sorbitol, manitol, xilitol, glicerol) a una concentración de 0.15 mM al medio de cultivo Man, Rogosa y Sharpe (MRS). La capacidad antifúngica fue ensayada utilizando el extracto libre de células después de 24 horas de cultivo sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* un hongo que se desarrolla en productos como el café de la variedad robusta y que es productor de micotoxinas. El fenómeno fue observado utilizando las técnicas de medios envenenados y discos de difusión en agar. Se encontró que cuando se cultivan las bacterias ácido lácticas en condiciones aerobias la adición de polioles no tiene un efecto sobre la capacidad antifúngica del extracto libre de células. Por otro lado, al realizar el cultivo en condiciones anaerobias se observó un aumento en la capacidad antifúngica. El mayor efecto se observó al agregar manitol en el medio MRS.

## Introducción

El uso de bacterias ácido lácticas como agentes de biocontrol en la industria alimenticia ha sido ampliamente utilizado con el fin de reducir el consumo de agentes provenientes de la síntesis química [1]

La presencia de micotoxinas ha sido reportada en diversos alimentos ocasionando pérdidas económicas de hasta el 25% [1]. Dentro de las principales micotoxinas reportadas se encuentran: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, patulina y ocratoxinas [2]. Dentro de las ocratoxinas la tipo A (OTA) es de mayor toxicidad. La OTA se encuentra clasificada por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) como posible agente carcinógeno humano y está relacionada con problemas nefrotóxicos, teratogénicos e inmunotóxicos [3].

Durante el procesamiento y almacenamiento inadecuado del café se produce OTA. El control biológico de los hongos productores de OTA es una alternativa para evitar la contaminación de alimentos. Se han reportado diversos compuestos antifúngicos (péptidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos de bajo peso molecular, etc.) producidos por bacterias ácido lácticas, cada uno de ellos con mecanismos de acción distinta de acuerdo con su naturaleza química. La presencia de polioles en el medio de cultivo de bacterias ácido lácticas favorece la producción de compuestos antifúngicos [4], en el caso del glicerol se ha encontrado que su fermentación produce reuterina un compuesto con propiedades antifúngicas [5]. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la adición de polioles (sorbitol, manitol, xilitol, glicerol) al medio de cultivo MRS sobre capacidad antifúngica de 4 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de café (J, 002, 031, y 034).

## Metodología

La activación de las bacterias ácido lácticas (J, 002, 031, y 034) se realizó a partir de criotubos con el microorganismo conservados en glicerol inoculando 50 µl del criotubo en 9 ml de medio MRS incubando 24 h a 30 °C, la primera resiembra fue efectuada en tubos falcon de 50 ml inoculando 36 ml de medio MRS con 4 ml del cultivo de activación e incubando 24 h a 30 °C. Se realizó una segunda resiembra repitiendo en condiciones aerobias. Para trabajar en condiciones anaerobias la resiembra se realizó en

botellas serológicas de 60 ml en las que se hizo circular una corriente de nitrógeno. Se obtuvo el extracto libre de células centrifugando los cultivos de las segundas resiembras a 6 500 rpm durante 15 min.

La activación de *Aspergillus carbonarius* se hizo inoculando 50 µl de un conservado de esporas en glicerol en un matraz con 30 ml de agar PDA e inoculando durante 7 días a 30 °C. Se realizó una resiembra colocando 500 µl en un matraz con 30 ml e incubando a 30 °C durante 7 días; se realizó una segunda resiembra inoculando 1 ml de una suspensión de esporas con una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml en cajas petri con 20 ml de agar Czapeck Extracto de Levadura (CYA).

Los medios de cultivo envenenados se prepararon en cajas petri con agar CYA y el extracto libre de células de la segunda resiembra de las bacterias ácido lácticas (50% v/v). En el centro de las cajas fueron colocados discos de 8 mm de diámetro del cultivo de *A. carbonarius*. Durante 3 días se evaluó el crecimiento radial del hongo con la ayuda de un vernier.

## Resultados

En condiciones aerobias el extracto libre de células resultó tener una actividad antifúngica baja (Figura 2), la cepa 031 presentó el mayor efecto bajo estas condiciones. Por otro lado, cuando se trabaja en anaerobiosis la capacidad antifúngica de los extractos libres de células es mayor siendo las bacterias 002 y 031 quienes presentan una mayor inhibición (Figura 1), también se encontró que en presencia de manitol el efecto antifúngico resultó favorecido.

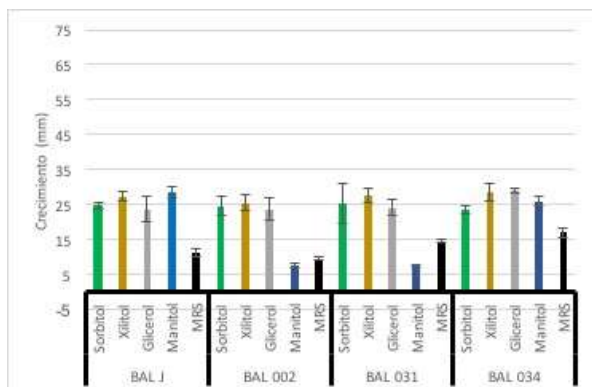


Figura 1. Crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* en medios envenenados con extracto libre de células de bacterias ácido lácticas cultivadas en anaerobiosis

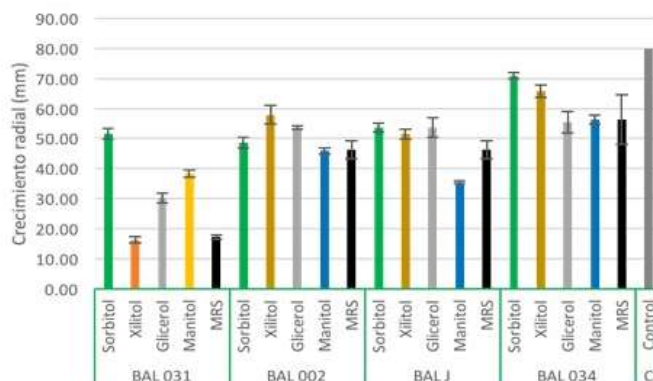


Figura 2. Crecimiento radial de *Aspergillus carbonarius* en medios envenenados con extracto libre de células de bacterias ácido lácticas cultivadas en aerobiosis

## Conclusiones

En este trabajo se encontró que la BAL 031 presentó la mayor actividad antifúngica. En condiciones de anaerobiosis la presencia de manitol en el cultivo de BAL favorece la capacidad antifúngica contra el crecimiento de *A. carbonarius*, posiblemente dicho compuesto actúa como aceptor de electrones.

## Referencias

- Spadaro, D.; Gullino, M.L. "State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases". International Journal of Food Microbiology, Amsterdam, v.91, No. 2, p.185-194, 2004.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Roussos, S., "Anaerobe Robusta coffee beans post-harvest micro flora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*", Anaerobe, Vol 17 No 6, p. 267-272, 2011.
- Codex Alimentarius. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de ocratoxina A en el café CAC/RCP 69-2009, 2009.
- Lipińska, L., Klewicki, R., Klewicka, E., Kołodziejczyk, K., Sójka, M., & Nowak, A., "Antifungal Activity of *Lactobacillus* sp. Bacteria in the Presence of Xylitol and Galactosyl-Xylitol". BioMed research international, Vol. 2016, 1-8, 2016.

5. Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F., "Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review". *Food control*, Vol. 21 No. 4, p. 370-380, 201

# ANÁLISIS DE LA VARIACIÓN DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL CULTIVO DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS SOBRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE *ASPERGILLUS CARBONARIUS*

Rubén Espinosa Salgado<sup>a</sup>, Karen Solares-Avila<sup>a</sup>, Isabelle Gaimé-Perraud<sup>b</sup>,  
Gabriela M. Rodríguez Serrano<sup>a</sup>, Gerardo Saucedo Castañeda<sup>a</sup>  
sucedo@xanum.uam.mx

<sup>a</sup>Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa,

<sup>b</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Francia.

## Resumen

Las bacterias ácido lácticas (BAL), son ampliamente utilizadas en la industria alimentos, las cuales poseen la capacidad de inhibir el crecimiento y desarrollo de patógenos. El medio de cultivo comúnmente utilizado para el cultivo de BAL es el MRS (Man Rogosa Sharpe), una de las fuentes de nitrógeno: el extracto de levadura está asociado a la producción de compuestos con capacidad antifúngica. En este trabajo se evaluaron 3 concentraciones (0-7 g/l) de extracto de levadura sobre la capacidad antifúngica de dos cepas de bacterias ácido lácticas (BAL 7 y BAL 031) para inhibir el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* proveniente de Costa de Marfil. Se determinó que el extracto de levadura no tiene un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento del hongo, por lo que podría ser retirado del medio de cultivo en la producción de compuestos antifúngicos.

## Introducción

Los consumidores son cada vez más conscientes de la calidad sanitaria de sus alimentos y de cómo se producen, transforman y comercializan. Se han reportado pérdidas económicas de hasta el 25% de alimentos [1] con la contaminación por micotoxinas: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, ocratoxinas y patulina [2].

El uso de bacterias ácido lácticas como agentes de biocontrol en la industria alimenticia ha sido ampliamente utilizado con el fin de reducir el consumo de agentes provenientes de la síntesis química [3].

Uno de los factores que influyen en la contaminación de alimentos es la presencia de hongos productores de micotoxinas dentro de las cuales se encuentran: aflatoxinas, tricotecenos, fumonisinas, patulina y ocratoxinas [2]. La ocratoxina tipo A (OTA) es de vital importancia debido a su toxicidad [4].

El control biológico de hongos productores de OTA es una alternativa para evitar su desarrollo. Se han reportado diversos compuestos antifúngicos (péptidos, ácidos orgánicos, compuestos fenólicos, compuestos de bajo peso molecular, etc.) producidos por bacterias ácido lácticas, cada uno de ellos con mecanismos de acción distinta de acuerdo con su naturaleza química.

El medio de cultivo utilizado para el cultivo de bacterias ácido lácticas es el medio MRS (Man Rogosa Sharpe). Se ha reportado que los componentes del medio modulan la producción de compuestos antimicrobianos [5]. En el presente trabajo se pretende contrastar la capacidad antifúngica de dos bacterias ácido lácticas: una proveniente de Costa de Marfil y la otra de México, sobre dos cepas de *Aspergillus Carbonarius* (DO089 y DO162) modificando las concentraciones del extracto de levadura en el medio MRS mediante pruebas de inhibición del crecimiento radial del hongo.

## Metodología

La activación de las bacterias ácido lácticas (031 y 7) se realizó a partir de criotubos con el microorganismo conservados en glicerol inoculando 50 µl del criotubo en 9 ml de medio MRS incubando 24 h a 30 °C. Se realizó una resiembra tomando 1 ml del cultivo de activación y 9 ml de medio MRS estéril con diferentes concentraciones de extracto de levadura (0, 2.5, 5, y 7 g/l) incubando durante 24 h a 30 °C.

Se realizó una segunda resiembra en botellas serológicas colocando 2.8 ml de la primer resiembra y 25 ml de medio de cultivo con las diferentes concentraciones de extracto de levadura, el cultivo se realizó durante 96 h a 30 °C, transcurrido este tiempo fue centrifugado el cultivo a 3500 rpm para obtener el extracto libre de células.

La activación de *Aspergillus carbonarius* se hizo inoculando 50 µl de un conservado de esporas en glicerol en un matraz con 30 ml de agar PDA y se incubó durante 7 días a 30 °C, posteriormente se realizó el raspado de esporas con una solución de Tween 80 al 0.1 % (v/v), a partir de la suspensión de esporas se hizo una primera resiembra colocando 500 µl del matraz de activación en otro con 30 ml de agar PDA incubando a 30 °C durante 7 días.

Los medios de cultivo envenenados se prepararon en cajas Petri con agar CYA y el extracto libre de células de bacterias ácido lácticas (50% v/v). En el centro de las cajas fueron colocados 100 µl de una suspensión de esporas a una concentración de  $1 \times 10^6$  del cultivo de *A. carbonarius* y se evaluó la inhibición durante 3 días a través del crecimiento radial del hongo con un vernier.

## Resultados

Del análisis realizado a través de una prueba de ANOVA y comparación de medias con prueba de Tuckey con una significancia de 0.05, no se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos, incluso al utilizar 5 g/l la concentración del medio MRS original.

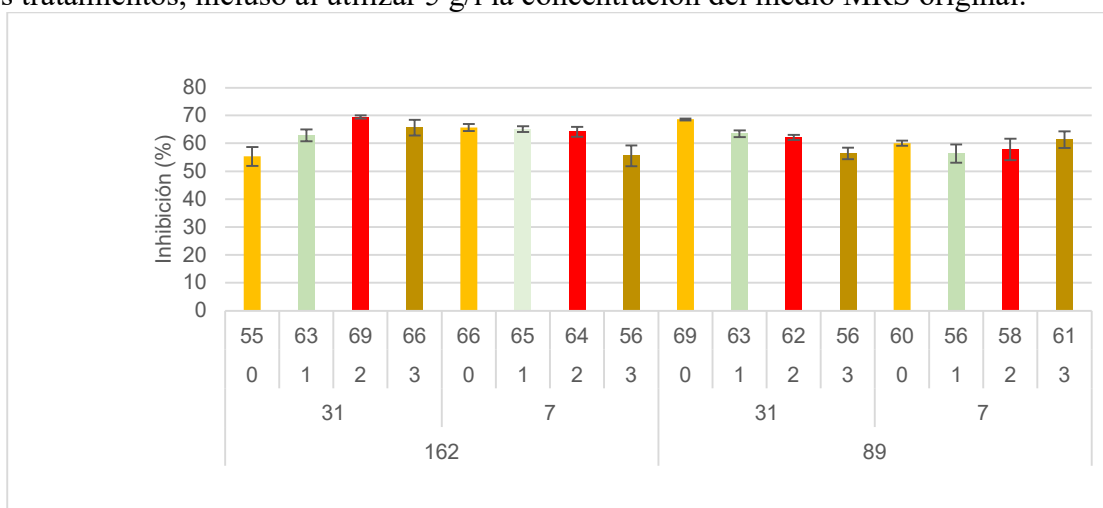


Figura 1. . Efecto sobre el porcentaje de inhibición del extracto libre de células de BAL a diferentes concentraciones de extracto de levadura sobre *A. Carbonarius*.

## Conclusiones

El extracto de levadura no tiene un efecto significativo sobre la inhibición de las dos cepas de *Aspergillus carbonarius* con las dos cepas de bacterias ácido lácticas evaluadas, por lo que podría este compuesto ser eliminado o reemplazado del medio de cultivo, debido a su alto costo y a que no afecta la capacidad de inhibición del extracto libre de células.

## Referencias

1. Spadaro, D., Gullino, M.L. State of the art and future prospects of biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam, 91(2) p.185-194. 2004.
2. Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Roussos, S., “Anaerobe Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*”, *Anaerobe*, 17(6), p. 267-272, 2011.
3. Prema, P., Smila, D., Palavesam, A., & Immanuel, G. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food and Bioprocess Technology*, 3(3), 379-386. 2010
4. Codex Alimentarius. Código de prácticas para prevenir y reducir la contaminación de ocratoxina A en el café CAC/RCP 69-2009, 2009.
5. Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F., Lactic acid bacteria–Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food control*, 21(4), p. 370-380, 2010.

# EFFECTO DE LA ADICIÓN DE POLIOLES AL CULTIVO DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* SOBRE EL CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA CONTRA *ASPERGILLUS CARBONARIUS*

Rubén Espinosa-Salgado<sup>a</sup>, Isabelle Perraud-Gaime<sup>b</sup>, Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>a</sup>, Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Depto. de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, CDMX, 09340, México.  
sucedo@xanum.uam.mx

<sup>b</sup>Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Marseille, France.

## Resumen

El uso de bacterias ácido lácticas como biocontrol de patógenos en productos de consumo humano presenta ventajas ante métodos físicos y químicos. Estos microorganismos producen compuestos antifúngicos durante su metabolismo primario y secundario, favoreciéndose su biosíntesis mediante la adición de factores nutricionales. En este trabajo se evalúa el efecto de la adición de polioles sobre el crecimiento y capacidad antifúngica del extracto libre de células. Se utilizaron dos cepas de *Lactobacillus plantarum* provenientes de procesos de ensilaje en Costa de Marfil y México, los polioles empleados fueron glicerol, xilitol, manitol y sorbitol, las curvas de crecimiento fueron ajustadas al modelo de Gompertz y la capacidad antifúngica fue determinada midiendo el crecimiento radial en cajas Petri de *Aspergillus carbonarius* utilizando la técnica de medios envenenados. En este trabajo, la mejor inhibición se obtuvo con la cepa 031 adicionando glicerol al medio de cultivo, las cepas en estudio fueron capaces de asimilar sorbitol y manitol, mientras que el xilitol y glicerol no fueron consumidos.

## Introducción

La contaminación de alimentos debido a la presencia de microorganismos genera pérdidas económicas de aproximadamente 1.3 billones de toneladas anuales [1]. Los principales hongos causantes de contaminación pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* [2]. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son empleadas como microorganismos antagonistas de patógenos debido a que producen diversos metabolitos con propiedades antimicrobianas [3]. Se ha encontrado que la adición de polioles aumenta el espectro de inhibición y el efecto antifúngico de las BAL [4]. En este trabajo se evaluó el consumo de glicerol, xilitol, manitol y sorbitol por *Lactobacillus plantarum*, así como el aumento del efecto inhibitorio del extracto libre de células sobre *Aspergillus carbonarius* debido a la presencia de estos compuestos.

## Metodología

La activación de las BAL 31 (Costa de Marfil) y ET7 (México) se realizó a partir de conservados en glicerol inoculando 50 µl en 9 ml de medio MRS incubando 24 h a 30 °C. Se realizó una resiembra en medio MRS estéril incubando durante 24 h a 30 °C. Para evaluar el crecimiento de las BAL en los distintos polioles se preparó la segunda resiembra con medio MRS sustituyendo la fuente de carbono con 20 g/l de cada poliol, las unidades formadoras de colonias (UFC) fueron determinadas por densidad óptica a 600 nm y los datos generados fueron ajustados al modelo de Gompertz utilizando el software OriginPro 2018. Para determinar la actividad antifúngica se llevó a cabo la segunda resiembra en botellas serológicas colocando 5 ml de la primer resiembra y 45 ml de medio de cultivo con 10 g/l de



glicerol, xilitol, manitol y sorbitol, los cultivos fueron incubados durante 96 h a 30 °C en camaras de anaerobiosis.

Se obtuvieron los extractos libres de células (ELC) centrifugando los caldos de fermentación a 7000 rpm durante 15 min a 10 °C y filtrando a 0.45 µm.

Se realizó una activación y dos resiembras de *Aspergillus carbonarius* DOI62 en agar papa dextrosa ajustando la concentración hasta obtener  $1 \times 10^6$  esporas/ml.

Las pruebas de inhibición se realizaron mediante la técnica de cultivos envenenados con medio PDA mezclándolo con 50 % (v/v) del ELC de cada poliol y se vertieron 20 ml de la mezcla en cajas Petri de 90x90, en el centro de las cajas se hicieron perforaciones de 8 mm de diámetro donde se colocaron 100 µl de la suspensión de esporas de *Aspergillus carbonarius* con  $1 \times 10^6$  esporas/ml. El halo de crecimiento radial se midió cada 24 h durante 72 h y se determinó la actividad antifúngica.

## Resultados

La cepas de *Lactobacillus plantarum* mostraron una disminución en la tasa máxima de crecimiento al cambiar glucosa como fuente de carbono por los polioles (figura 1) en el caso de la ET7 se obtuvieron valores de 0.22, 0.17, 0.15, 0.10, 0.07 h<sup>-1</sup> y para la 31 de 0.27, 0.13, 0.10, 0.07 y 0.09 h<sup>-1</sup> con glucosa, manitol, sorbitol, xilitol y glicerol respectivamente, dicha disminución en el crecimiento corresponde con los perfiles de consumo (Figura 2) donde se observa un consumo cercano al 100 % con glucosa, seguido por el manitol y sorbitol, con xilitol del 20 % y con glicerol no hubo consumo. En cuanto a los resultados de inhibición se obtuvo para el caso de la BAL 31 una inhibición del crecimiento radial cercana al 90% al utilizar xilitol y glicerol en el medio de cultivo, en cuanto a la BAL ET7 del 60%, con glucosa del 40 en ambos casos, y con manitol y sorbitol menor al 20%.

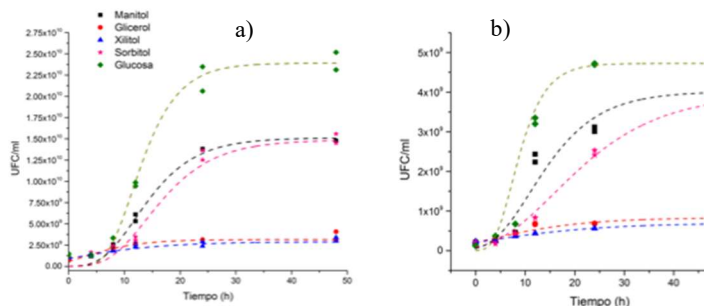


Figura 1. Cinéticas de crecimiento para *Lactobacillus plantarum* utilizando como fuente de carbono polioles, a) cepa ET7 y b) cepa 31

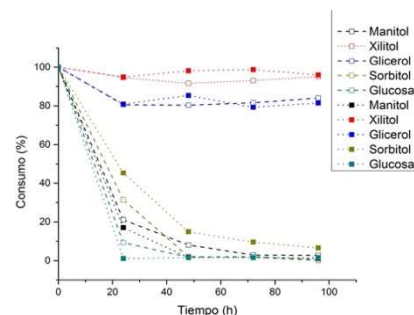


Figura 2. Consumo de polioles por *Lactobacillus plantarum*. Los cuadros rellenos corresponden a la cepa 31 y los vacíos a la ET7

## Conclusiones

Las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* consumieron manitol y sorbitol como fuente de carbono, mostrando un crecimiento menor al que se obtiene utilizando glucosa como fuente de carbono, el xilitol fue consumido en un 20% mientras que el glicerol no fue asimilado, no obstante, se obtiene una mayor inhibición del ELC al utilizar xilitol y glicerol, posiblemente

se deba a que los compuestos antifungicos producidos se obtengan durante el metabolismo secundario de las bacterias.

### Referencias

1. Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., Coton, E. “Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review”. *Microorganisms* 5 (2017), 37.
2. Ogunade, I.M., Martinez-Tupia, C., Queiroz, O.C.M., Jiang, Y., Drouin, P., Wu, F., Vyas, D., Adesogan, A.T. “Silage review: Mycotoxins in silage: Occurrence, effects, prevention, and mitigation” *J. Dairy Sci.* 101 (2018), 4034–4059.
3. Kwak, M.K., Liu, R., Kwon, J.O., Kim, M.K., Kim, A.H.J., Kang, S.O., “Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit proliferation of the influenza a virus”. *J. Microbiol.* 51 (2013), 836–843.
4. Lipińska, L., Klewicki, R., Sójka, M., Bonikowski, R., Żyżelewicz, D., Kołodziejczyk, K., Klewicka, E., “Antifungal Activity of *Lactobacillus pentosus* ŁOCK 0979 in the Presence of Polyols and Galactosyl-Polyols”. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 10 (2018), 186–200.



## Polyols Induce the Production of Antifungal Compounds by *Lactobacillus plantarum*

Ruben Espinosa-Salgado<sup>1</sup> · Victoria Tamayo-Galván<sup>2</sup> · Isabelle Perraud-Gaime<sup>3</sup> · Gabriela M. Rodríguez-Serrano<sup>1</sup> · Rosa O. González-Robles<sup>4</sup> · Noel Durand<sup>5</sup> · Elena I. Champion-Martínez<sup>1,6</sup> · Gerardo Saucedo-Castañeda<sup>1</sup> 

Received: 23 April 2021 / Accepted: 5 January 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022