



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
Unidad Iztapalapa  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Posgrado en Biotecnología

**“Evaluación de la capacidad inhibitoria y de detoxificación de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A”**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:  
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

**PRESENTA:**

DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ GLORIA ANGÉLICA  
2173805717  
gloria.dominguez.gutierrez@gmail.com  
ORCID: 0000-0002-1464-315X

**DIRECTORA DE TESIS:**

Dra. Gabriela Mariana Rodríguez Serrano

**JURADO:**

Presidente:

Dr. Jesús Gerardo Saucedo Castañeda

Secretario:

Dr. Sergio Andrés Alatorre Santamaría

Vocal:

Dra. Gloria Díaz Ruíz

Vocal:

Dr. Héctor Bernardo Escalona Buendía

Iztapalapa, Ciudad de México a 28 de Noviembre de 2024



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA**  
Unidad Iztapalapa

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

**POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA**

**Evaluación de la capacidad inhibitoria y de detoxificación  
de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento de  
*Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA:

**M. en B. Gloria Angélica Domínguez Gutiérrez**

**Directora: Dra. Gabriela M. Rodríguez Serrano**

Universidad Autónoma Metropolitana –  
Iztapalapa

**Comité asesor: Dr. Noël Durand**

Qualisud (CIRAD, Francia)

**Dr. J. Gerardo Saucedo Castañeda**

Universidad Autónoma Metropolitana –  
Iztapalapa

Ciudad de México, Noviembre 2024.



**Casa abierta al tiempo**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA**  
**METROPOLITANA**  
**Unidad Iztapalapa**

El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana de la Unidad Iztapalapa está incluida en el Programa Nacional de Posgrado de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT) con la referencia 001466. GADG agradece el apoyo de la beca del CONAHCyT (CVU 868699) y de la Universidad Autónoma Metropolitana para la obtención de grado de Doctora en Biotecnología. Se agradece el apoyo del Proyecto Angelica (273656) de la parte del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCyT, de México) y la Agence Nationale de la Recherche (ANR, de Francia).

**CONSTANCIA DE PRESENTACION DE EXAMEN DE GRADO**

La Universidad Autónoma Metropolitana extiende la presente CONSTANCIA DE PRESENTACION DE DISERTACION PÚBLICA de DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA de la alumna GLORIA ANGELICA DOMINGUEZ GUTIERREZ, matrícula 2173805717, quien cumplió con los 316 créditos correspondientes a las unidades de enseñanza aprendizaje del plan de estudio, 45 créditos de PUBLICACION y 45 créditos de EXAMEN PREDOCTORAL. Con fecha veintiocho de noviembre del 2024 presentó la DEFENSA de su DISERTACION PÚBLICA cuya denominación es:

Evaluación de la capacidad inhibitoria y de detoxificación de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A

Debe mencionar que la aprobación tiene un valor de 45 créditos y el programa consta de 451 créditos.

El jurado del examen ha tenido a bien otorgarle la calificación de:

APROBAR

**JURADO**

**Presidente**



DR. JESUS CERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA

**Secretario**



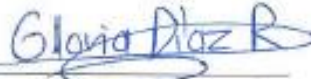
DR. SERGIO ANDRÉS ALATORRE SANTAMARÍA

**Vocal**



DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDÍA

**Vocal**



DRA. GLORIA DÍAZ RUIZ

## *Agradecimientos*

*A mis padres que son un pilar muy importante en mi vida, sin su apoyo y amor incondicional no estaría culminando esta etapa de mi vida. A ellos les debo los logros que he cumplido, muchas gracias por estar siempre conmigo, aún en la distancia.*

*A la Dra. Gabriela Rodríguez por su invaluable apoyo y guía a lo largo de mi trayectoria académica. Sin duda su experiencia y conocimiento han enriquecido esta investigación. Estoy muy agradecida por su confianza en mí y por haberme brindado la oportunidad de aprender bajo su tutela.*

*Al Dr. Gerardo Saucedo por sus enseñanzas y guía, su dedicación, paciencia y compromiso han sido fundamentales para mi crecimiento académico y personal. Gracias por los consejos y los conocimientos brindados, así como por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.*

*Al Dr. Noël Durand por compartir sus conocimientos conmigo, gracias también por haberme aceptado durante la estancia y depositar su confianza en mí, esta experiencia ha dejado una gran huella en mi vida y mi carrera.*

*Agradezco a los sinodales por tomarse el tiempo de leer y revisar este documento, sus comentarios serán muy valiosos para pulir este texto.*

*A mis compañeros de laboratorio por brindarme su ayuda cuando así lo necesité.*

*A Ricardo por su cariño y apoyo en todo momento, animándome en momentos difíciles y en los no tan difíciles.*

## Resumen

---

El acceso a alimentos inocuos garantiza el bienestar y la supervivencia de la humanidad; sin embargo, existe un riesgo de contaminación por ciertos hongos que pueden producir micotoxinas, sustancias que poseen efectos negativos comprobados contra la salud. Entre ellas la Ocratoxina A (OTA) puede generar toxicidad en el hígado y los riñones y carcinogenicidad. Una estrategia para abordar los problemas de contaminación por micotoxinas consiste en el biocontrol, la cual es una estrategia que utiliza microorganismos como las bacterias ácido lácticas (BAL) y/o sus metabolitos para inhibir el crecimiento de hongos micotoxigénicos. En el presente trabajo se estudiaron metodologías para ofrecer una estrategia de biocontrol de hongos ocratoxigénicos con BAL cultivadas en un medio formulado con extracto de germen de malta (MEGM). Durante la fase inicial se compararon los modelos cinéticos logístico y de Gompertz con el objeto de seleccionar el que describa más adecuadamente el crecimiento de *Lactiplantibacillus plantarum* B31 para determinar las condiciones en las que se obtenga la mayor concentración de biomasa y ácido láctico (AL) y emplearlas como agentes de biocontrol contra *Aspergillus carbonarius* Ac 089. El modelo de Gompertz presentó un mejor ajuste que el modelo logístico para simular el comportamiento de los datos experimentales. Seis cepas de BAL fueron seleccionadas para ser cultivadas en el medio propuesto (MEGM) y comparar su crecimiento con el medio referencia De Man, Rogosa, Sharpe (MRS); no hubo diferencias significativas en el crecimiento de todas las cepas en ambos medios; dos de las seis BAL mostraron el mayor crecimiento, *L.*

*plantarum* B7 con  $4.0 \pm 0.20$  g/L y *L. plantarum* B31 con  $3.2 \pm 0.4$  g/L. La siguiente fase consistió en estudiar la capacidad de inhibición del crecimiento y la reducción de la concentración de OTA de las dos cepas que mostraron mayor crecimiento en el MEGM sobre *A. carbonarius* Ac 089. Se probaron diferentes concentraciones celulares y el extracto libre de células (ELC) de ambas BAL. El tratamiento que inhibió el 100 % del crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y con el que no se observó producción de OTA fue emplear una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de *L. plantarum* B7 o de *L. plantarum* B31, es decir, una relación de  $2 \times 10^5$  BAL/espora. Se determinó que *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 pueden adsorber o secuestrar la OTA en un 100 % con células no viables. Los resultados obtenidos en este estudio ponen en evidencia el potencial del uso de BAL cultivadas en un medio formulado con EGM como agentes de biocontrol contra hongos productores de ocratoxinas.



## Abstract

---

Access to safe food guarantees the well-being and survival of humanity; however, there is a risk of contamination by certain fungi that can produce mycotoxins, substances that have proven negative effects on health. Among them, Ochratoxin A (OTA) can cause toxicity in the liver and kidney and carcinogenicity. One strategy to address mycotoxin contamination problems is biocontrol, which is a strategy that uses microorganisms such as lactic acid bacteria (LAB) and/or their metabolites to inhibit the growth of mycotoxigenic fungi. In this work, methodologies were studied to offer a biocontrol strategy for ochratoxigenic fungi with LAB grown in a medium formulated with malt germ extract (MEGM). During the initial phase, the logistic and Gompertz kinetic models were compared to select the one that best describes the growth of *Lactiplantibacillus plantarum* B31 to determine the conditions under which the highest concentration of biomass and lactic acid (LA) is obtained and to use them as biocontrol agents against *Aspergillus carbonarius* Ac 089. The Gompertz model presented a better fit than the logistic model to simulate the behavior of the experimental data. Six LAB strains were selected to be cultured in the proposed medium (MEGM) and compare their growth with the reference medium De Man, Rogosa, Sharpe (MRS); there were no significant differences in the growth of all strains in both media; two of the six LAB showed the highest growth, *L. plantarum* B7 with  $4.0 \pm 0.20$  g/L and *L. plantarum* B31 with  $3.2 \pm 0.4$  g/L. The next phase consisted of studying the growth inhibition capacity and the reduction of the OTA concentration of the two strains that showed the greatest growth in the MEGM on A.

*carbonarius* Ac 089. Different cell concentrations and the cell-free extract (CFE) of both LAB were tested. The treatment that inhibited 100% of the growth of *A. carbonarius* Ac 089 and with which no OTA production was observed was using a concentration of  $1 \times 10^9$  CFU/mL of *L. plantarum* B7 or *L. plantarum* B31, that is, a ratio of  $2 \times 10^5$  LAB/spore. It was determined that *L. plantarum* B7 and *L. plantarum* B31 can adsorb or sequester 100 % of OTA with non-viable cells. The results obtained in this study demonstrate the potential of using LAB cultured in a medium formulated with EGM as biocontrol agents against ochratoxin-producing fungi.

## Índice de contenido

---

1 ▶	Introducción .....	1
2 ▶	Revisión bibliográfica .....	3
2.1	Inocuidad alimentaria .....	3
2.1.1	Estrategias de solución a los problemas de inocuidad alimentaria .....	6
2.1.2	Etapas del procesamiento de alimentos vulnerables a la contaminación .....	9
2.2	Micotoxinas .....	12
2.2.1	Condiciones que favorecen el desarrollo de las micotoxinas.....	13
2.2.2	Importancia de las micotoxinas en la salud humana.....	15
2.2.3	Ocratoxina A .....	21
2.2.4	Métodos físicos, químicos y biológicos de detoxificación de micotoxinas .....	24
2.3	Bacterias ácido lácticas.....	26
2.3.1	Clasificación de las bacterias ácido lácticas .....	26
2.3.2	Requerimientos nutricionales.....	29
2.3.3	Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas .....	33
3 ▶	Justificación .....	40
4 ▶	Hipótesis .....	41
5 ▶	Objetivos.....	42
5.1	Objetivo General .....	42
5.2	Objetivos Específicos.....	42
6 ▶	Estrategia experimental .....	43
7 ▶	Materiales y métodos.....	44
7.1	Microorganismos y condiciones de cultivo .....	44
7.1.1	Bacterias ácido lácticas .....	44
7.1.2	<i>Aspergillus carbonarius</i> Ac 089 .....	45
7.2	Medio de cultivo con extracto de germen de malta .....	45
7.2.1	Preparación del extracto de germen de malta para el medio de cultivo. ....	45
7.2.2	Condiciones de cultivo de bacterias ácido lácticas en el medio con extracto de germen de malta .....	48
7.3	Inhibición de crecimiento de <i>A. carbonarius</i> Ac 089 y reducción de la producción de ocratoxina A.....	48

7.3.1	Técnica de cultivos envenenados con células viables .....	49
7.3.2	Técnica de cultivos envenenados con extracto libre de células .....	50
7.4	Adsorción y biodegradación de micotoxinas por bacterias ácido lácticas ....	51
7.4.1	Ensayos con bacterias ácido lácticas viables .....	51
7.4.2	Ensayos con bacterias ácido lácticas no viables .....	52
7.5	Análisis de aflatoxina B1 y ocratoxina A.....	53
7.5.1	Extracción de aflatoxina B1 y ocratoxina A .....	53
7.5.2	Cuantificación de aflatoxina B1 y ocratoxina A .....	54
7.6	Consideraciones matemáticas para el análisis del crecimiento de <i>L. plantarum</i> B31 y la formación de ácido láctico .....	55
8	► Resultados y discusión .....	58
8.1	Análisis del crecimiento y formación de ácido láctico de <i>L. plantarum</i> B31..	58
8.1.1	Análisis del crecimiento de <i>L. plantarum</i> B31 .....	58
8.1.2	Análisis de la formación de ácido láctico de <i>L. plantarum</i> B31 .....	65
8.1.3	Comparación entre los modelos Logístico y Gompertz acoplados al modelo de Luedeking-Piret.....	68
8.2	Evaluación del crecimiento de bacterias ácido lácticas en medio con extracto de germen de malta .....	73
8.3	Inhibición del crecimiento de <i>A. carbonarius</i> Ac 089 y de la producción de ocratoxina A .....	76
8.3.1	Inhibición del crecimiento en presencia de bacterias ácido lácticas .....	76
8.3.2	Inhibición del crecimiento con el extracto libre de células.....	83
8.3.3	Inhibición de la producción de ocratoxina A en presencia de bacterias ácido lácticas .....	87
8.3.4	Inhibición de la producción de ocratoxina A con el extracto libre de células.....	94
8.4	Adsorción de micotoxinas por bacterias ácido lácticas .....	97
8.4.1	Adsorción de micotoxinas por células viables .....	97
8.4.2	Adsorción de micotoxinas por células no viables .....	101
9	► Conclusiones .....	104
10	► Referencias.....	107
11	► Anexos .....	121

## Índice de figuras

---

<b>Figura 2.1</b> - Especies de <i>Aspergillus</i> en productos alimenticios: A) <i>A. westerdijkiae</i> en frutos secos; B) <i>A. flavus</i> en almendras; C) <i>A. flavus</i> en granos de maíz; D) <i>A. flavus</i> en mazorca de maíz, E) <i>A. niger</i> en mazorca de maíz; F) <i>A. carbonarius</i> en uvas. Tomado de Mycotoxigenic Fungi, Springer (2017) <a href="https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0">https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0</a> .....	5
<b>Figura 2.2</b> - Principales estrategias para prevenir la contaminación de alimentos de origen agrícola. Modificado de Handbook of Food Bioengineering, Microbial Contamination and Food Degradation, Academic Press (2018) <a href="https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00001-9">https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00001-9</a> .....	6
<b>Figura 2.3</b> - Puntos críticos del procesamiento de alimentos agrícolas vulnerables a sufrir contaminación. Modificado de J. Food Sci, 83 (6), (2018). <a href="https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181">https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181</a> .....	9
<b>Figura 2.4</b> - Rango de temperaturas mínimo, óptimo y máximo (°C) para la producción de micotoxinas por diferentes hongos. Adaptado de Fungal Reproduction and Growth. IntechOpen, (2022). <a href="https://doi.org/10.5772/intechopen.100207">https://doi.org/10.5772/intechopen.100207</a> .....	14
<b>Figura 2.5</b> - Estructura química de las principales micotoxinas que afectan la salud humana. (Fuente: <a href="http://www.chemdraw.com">www.chemdraw.com</a> ) .....	18
<b>Figura 2.6</b> - Estructuras químicas de la OTA y sus derivados. Adaptado de: Toxins 2016, 8, 111. <a href="https://doi.org/10.3390/toxins8040111">https://doi.org/10.3390/toxins8040111</a> .....	22
<b>Figura 2.7</b> - Principales métodos de prevención y detoxificación de micotoxinas. Fuente: elaboración propia.....	24
<b>Figura 2.8</b> - Árbol filogenético del genoma central de la familia <i>Lactobacillaceae</i> . (Tomado de Int J Syst Evol Microbiol 70, 2782 (2020); <a href="https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107">https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107</a> ). El siguiente enlace dirige a una versión más amplia de la figura: <a href="https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/70/4/ijsem004107-f2.gif">https://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/ijsem/70/4/ijsem004107-f2.gif</a> .....	28
<b>Figura 2.9</b> - Rutas bioquímicas de la transformación de glucosa. (a) Metabolismo homofermentativo a través de la vía de Emden-Meyerhoff. (b) Metabolismo heterofermentativo a través de la vía de la fosfoacetolasa. Adaptado de Curr. Opin. Food Sci. 2, (2015). <a href="https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.03.001">https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.03.001</a> ).....	30
<b>Figura 2.10</b> - Mecanismos de interacción de BAL vs hongos. Modificado de: Compr Rev Food Sci Food Saf. 18(5), (2019). <a href="https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481">https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481</a> .	36
<b>Figura 6.1</b> - Estrategia experimental diseñada en cuatro etapas con actividades generales y particulares.....	43
<b>Figura 8.1</b> – Curva de crecimiento bacteriano típica. $\ln(N/N_0)$ es el logaritmo del número de organismos representados en función del tiempo. A es la asíntota que indica el momento donde la tasa de crecimiento disminuye. $\mu_m$ representa la tasa de	

crecimiento específica y $\lambda$ corresponde a la fase lag. Tomado de: Appl. Environ. Microbiol., 56 (1990). DOI:0099-2240/90/061875-07\$02.00/0.....	59
<b>Figura 8.2</b> - Cinéticas de crecimiento <i>L. plantarum</i> B31 ajustadas al modelo clásico y cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS (véase Int. J. Food Microbiol, 404 (2), 2023), <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320">https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320</a> . La línea azul representa la ecuación de la recta calculada de 0 a 6 h. ....	61
<b>Figura 8.3</b> - Cinéticas de crecimiento <i>L. plantarum</i> B31 ajustadas al modelo logístico (líneas azules) y Gompertz (líneas rojas) cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS (véase Int. J. Food Microbiol, 404 (2), 2023), <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320">https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320</a> . ....	64
<b>Figura 8.4</b> - Cinéticas de formación de ácido láctico de <i>L. plantarum</i> B31 ajustadas al modelo logístico (líneas azules) y Gompertz (líneas rojas) cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS ((véase Int. J. Food Microbiol, 404 (2), 2023), <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320">https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320</a> . ....	67
<b>Figura 8.5</b> - Inhibición del crecimiento (%) de <i>A. carbonarius</i> Ac 089 en agar MRS y agar MEGM durante seis días de cultivo con diferentes concentraciones de <i>L. plantarum</i> B7 y <i>L. plantarum</i> B31.....	77
<b>Figura 8.6</b> - Inhibición del crecimiento (%) de <i>A. carbonarius</i> Ac 089 en agar MRS y en agar MEGM durante seis días de cultivo con el extracto libre de células de <i>L. plantarum</i> B7 y <i>L. plantarum</i> B31.....	84
<b>Figura 8.7</b> - Reducción de la concentración de OTA (%) de <i>A. carbonarius</i> Ac 089 a los 3 y 6 días de cultivo con diferentes concentraciones de <i>L. plantarum</i> B7 y <i>L. plantarum</i> B31.....	88
<b>Figura 8.8</b> - OTA y AFB1 ligada (%) en las células de <i>L. plantarum</i> B7 y <i>L. plantarum</i> B31 a las 6, 24 y 96 h de cultivo.....	98

## Índice de tablas

---

<b>Tabla 2.1</b> - Agentes clasificados por las monografías del IARC, volúmenes 1 a 136 y algunos ejemplos.....	16
<b>Tabla 2.2</b> - Contenido máximo de micotoxinas en productos alimenticios de acuerdo con el Reglamento (CE) no 2023/915 de la Comisión del 25 de abril de 2023 del Parlamento Europeo y del Consejo.....	20
<b>Tabla 2.3.</b> - Principales aplicaciones de BAL. (Modificado de Dairy, 1(3), 2020.; <a href="https://doi.org/10.3390/dairy1030015">https://doi.org/10.3390/dairy1030015</a> ).....	34
<b>Tabla 7.1</b> - Composición del medio de cultivo para disolver en 1 L de extracto de germen de malta MEGM. ....	47
<b>Tabla 8.1</b> - Parámetros del modelo Logístico acoplado a Luedeking-Piret y del modelo Gompertz acoplado a Luedeking-Piret de <i>L. plantarum</i> B31 cultivada en los medios M1, M2, M3, M4 y MRS (véase Int. J. Food Microbiol, 404 (2), 2023) <a href="https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320">https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320</a> . ....	69
<b>Tabla 8.2</b> – Comparación del crecimiento de BAL en caldo MEGM y MRS. ....	74
<b>Tabla 8.3</b> - Reducción de la concentración de OTA (%) por <i>A. carbonarius</i> Ac 089 a los 3 y 6 días de cultivo con el extracto libre de células de <i>L. plantarum</i> B7 y <i>L. plantarum</i> B31. ....	94

# 1 ▶ Introducción

La salud y el bienestar de la humanidad dependen de múltiples factores, aunque en gran medida, del acceso a una diversidad de alimentos seguros. Por ello, es esencial disponer de los recursos necesarios para garantizar la inocuidad alimentaria en cada fase de la cadena del suministro de alimentos, que incluye la cosecha, procesamiento, almacenamiento, distribución y consumo (Swami & Gondil, 2020).

Uno de los principales agentes que puede comprometer la inocuidad de los alimentos son hongos, levaduras o bacterias. En particular, los hongos que contaminan los alimentos se caracterizan por su comportamiento oportunista al colonizar y reproducirse principalmente en granos y semillas bajo ciertas condiciones de almacenamiento (Qiu et al., 2021).

La presencia de hongos en alimentos supone un riesgo ya que algunos son capaces de producir micotoxinas, metabolitos secundarios que pueden causar una variedad de efectos adversos para la salud humana (Alshannaq & Yu, 2017). Se han identificado alrededor de 400 micotoxinas en la naturaleza, entre las que se encuentra la ocratoxina A (OTA), una de la más peligrosas para la salud humana



debido a que puede provocar daños en el riñón y en el hígado, ya que inhibe la síntesis de proteínas en estos órganos por interferencia con la actividad de la fenilalanina hidroxilasa (Ostry et al., 2017). Además, es inmunotóxica, genotóxica, neurotóxica, teratogénica y embriotóxica tanto en humanos como en animales (Alshannaq & Yu 2017).

Una de las estrategias para hacer frente al problema de la presencia de hongos ocratoxigénicos en alimentos es el biocontrol con bacterias ácido lácticas (BAL), quienes poseen la capacidad para inhibir el crecimiento de hongos en los alimentos a través de diferentes mecanismos como la producción de metabolitos antifúngicos, el contacto directo de células fúngicas con la pared celular de las células bacterianas y la competencia por espacio y nutrientes (Schnürer & Magnusson 2005). Además, se ha reportado que algunas especies de BAL son capaces de participar en la detoxificación de alimentos con OTA, proceso que involucra la degradación química/enzimática, la conversión metabólica y un proceso de adsorción de la micotoxina en la pared celular de las BAL (Bangar et al., 2022).

En este contexto y con el fin de limitar la contaminación de micotoxinas en alimentos, el objetivo principal de esta tesis fue determinar la capacidad de inhibición de BAL cultivadas en un medio de cultivo formulado con extracto de germen de malta (EGM) sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* Ac. 089, la producción de OTA y su capacidad de biotransformar o secuestrar la OTA.

## 2 ▶ Revisión bibliográfica

### 2.1 Inocuidad alimentaria

El bienestar y la supervivencia de la humanidad están estrechamente relacionados con el acceso a alimentos inocuos; por ello es indispensable contar con las herramientas que garanticen la seguridad de los alimentos a lo largo de cada etapa de la cadena alimentaria: producción, cosecha, procesamiento, almacenamiento, distribución y consumo (Swami & Gondil, 2020).

Los principales agentes que pueden comprometer la inocuidad de los alimentos se pueden agrupar en factores microbiológicos y químicos (Barzegar et al., 2023). Los factores microbiológicos pueden verse dominados por la presencia de bacterias. De acuerdo con Fung et al. (2018), más del 90% de las enfermedades por intoxicación alimentaria son causadas por especies de *Staphylococcus*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Vibrio*, *Bacillus* y *Escherichia coli*. Estos microorganismos provocan enfermedades como gastroenteritis, síndromes neurológicos, hepáticos y renales (Fung et al., 2018).

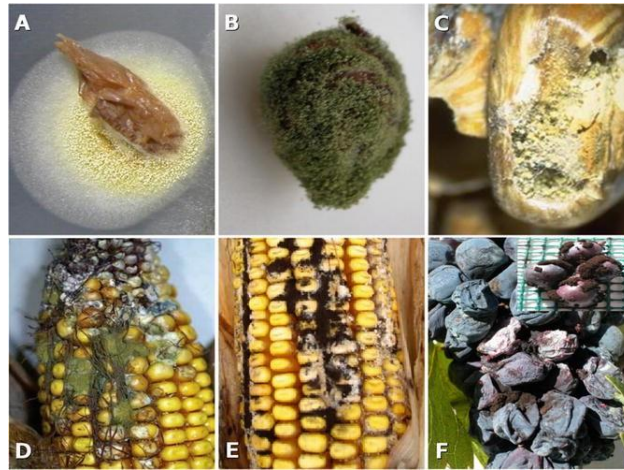
Por otro lado, diversos hongos y levaduras también actúan como agentes microbiológicos que pueden contaminar y producir cambios indeseables en los alimentos. Los hongos tienen la capacidad de prosperar en diferentes entornos, con

humedades relativas entre 80 y 90 % y con actividad de agua ( $a_w$ ) por encima de 0.75 (Awuchi et al., 2022). Son conocidos por su naturaleza oportunista al colonizar y multiplicarse en casi cualquier clase de alimentos con facilidad mediante la dispersión de sus esporas en el aire (Qiu et al., 2021).

Estos microorganismos no solo afectan negativamente las características organolépticas y la vida de anaquel de los alimentos, también alteran su inocuidad. Según Sadiq et al. (2019) existe una pérdida anual de entre 5 y 10 % de alimentos en el mundo debido al deterioro por hongos lo cual más allá de generar pérdidas agrícolas y económicas, plantea graves problemas de seguridad alimentaria como resultado de la capacidad de muchas especies de hongos de producir micotoxinas que son perjudiciales para la salud humana y animal.

En la [Figura 2.1](#) se presentan alimentos contaminados con algunas especies de *Aspergillus*, uno de los géneros de hongos que se ha encontrado con mayor frecuencia en distintos alimentos. El hongo es capaz de colonizar incluso la superficie entera del alimento, volviéndolo no apto para el consumo ya que durante su crecimiento puede producir sustancias dañinas para la salud del consumidor (Moretti & Susca, 2017).

Algunas de estas sustancias producidas por los hongos son las micotoxinas, metabolitos secundarios tóxicos que pueden causar una variedad de efectos adversos para la salud animal y humana (Alshannaq & Yu, 2017).

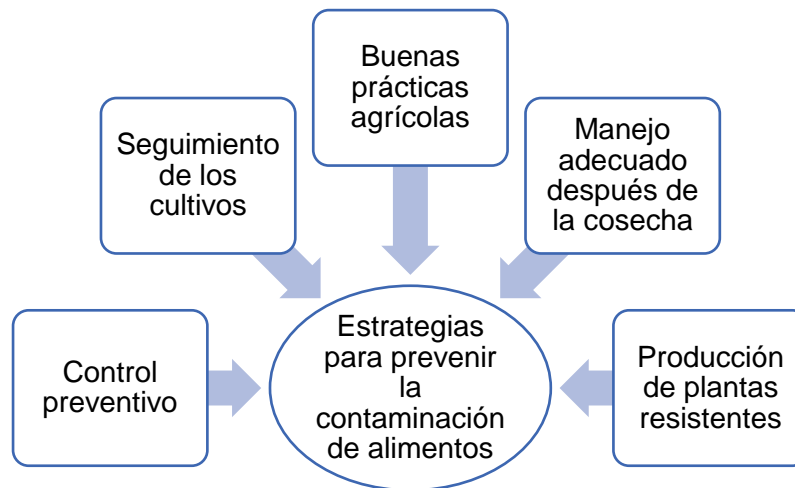


**Figura 2.1** - Especies de *Aspergillus* en productos alimenticios: A) *A. westerdijkiae* en frutos secos; B) *A. flavus* en almendras; C) *A. flavus* en granos de maíz; D) *A. flavus* en mazorca de maíz, E) *A. niger* en mazorca de maíz; F) *A. carbonarius* en uvas. Tomado de *Mycotoxigenic Fungi*, Springer (2017)  
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0>

En cuanto a los factores químicos que pueden afectar la inocuidad de los alimentos, existen sustancias tanto orgánicas como inorgánicas, entre ellas pesticidas, colorantes, antibióticos, hidrocarburos aromáticos y metales pesados, que pueden provenir de distintas fuentes. Onyeaka et al. (2024) señalaron que las condiciones del suelo y actividades antropogénicas como la actividad minera, pueden propiciar la acumulación de metales en el entorno en donde se cultivan alimentos. Además, algunas sustancias como los pesticidas, los bifenilos policlorados y los hidrocarburos pueden ingresar a los alimentos a través de factores ambientales. Estas sustancias pueden causar distintos efectos perjudiciales para la salud, que pueden ser lo mismo agudos que crónicos, desde síntomas menores como dolores de cabeza y náuseas, hasta problemas más serios que incluyen defectos de nacimiento, alteraciones en el desarrollo, trastornos neurológicos e incluso cáncer (Onyeaka et al., 2024).

### 2.1.1 Estrategias de solución a los problemas de inocuidad alimentaria

Las principales estrategias que buscan disminuir los problemas de inocuidad en los alimentos involucran principalmente el control preventivo durante las etapas del procesamiento de alimentos. En la [Figura 2.2](#) se resumen las principales estrategias para prevenir la contaminación de alimentos de origen agrícola. Todo ello implica actividades como el seguimiento de los cultivos, las buenas prácticas agrícolas, el manejo y secado suficiente de los cultivos después de la cosecha, la producción de plantas resistentes, así como el establecimiento de programas gubernamentales de detección y regulación en los países (Fiscal-Arjona, 2019).



**Figura 2.2** - Principales estrategias para prevenir la contaminación de alimentos de origen agrícola. Modificado de *Handbook of Food Bioengineering, Microbial Contamination and Food Degradation*, Academic Press (2018) <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00001-9>.

Es importante que, tanto agricultores, productores y organizaciones gubernamentales cuenten con programas que busquen implementar estrategias para proteger a los consumidores de los diferentes contaminantes, ya sean

microbiológicos o químicos y preservar la seguridad de la cadena de suministro de alimentos (Onyeaka et al., 2024).

Las buenas prácticas agrícolas abarcan la aplicación controlada de fertilizantes y pesticidas, la clasificación y segregación de las partes visiblemente contaminadas de un lote, el remojo y lavado de granos, evitar el riego por aspersión para limitar la dispersión de las esporas fúngicas, la poda y rotación de cultivos, así como el aseguramiento de condiciones higiénicas óptimas durante el proceso de cultivo (Adebo et al., 2021; FAO, 2017). Algunas de estas prácticas se encuentran dictadas en códigos o directrices establecidas por organizaciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) (FAO, 2017).

El manejo adecuado después de la cosecha abarca desde la correcta manipulación y el almacenamiento hasta transporte de los productos agrícolas. Durante la recolección, es esencial seguir protocolos rigurosos para prevenir la contaminación cruzada y la exposición a agentes contaminantes del entorno. El almacenamiento de los alimentos se debe realizar en condiciones controladas de temperatura y humedad, de ser posible utilizar sistemas de refrigeración y ventilación adecuados para mantener estos parámetros dentro de límites seguros (Borém & de Andrade, 2019). Las instalaciones de almacenamiento deben estar limpias y libres de plagas que puedan contaminar los productos. Además, los alimentos deben ser almacenados en recipientes limpios y apropiados que eviten el contacto con

superficies potencialmente contaminadas (Chatterjee & Abraham, 2018). Asimismo, el transporte debe realizarse en condiciones que preserven la calidad del producto, con vehículos limpios y equipados para mantener la temperatura adecuada. Separar los productos contaminados de los limpios es crucial para impedir la propagación de contaminantes (Borém & de Andrade, 2019).

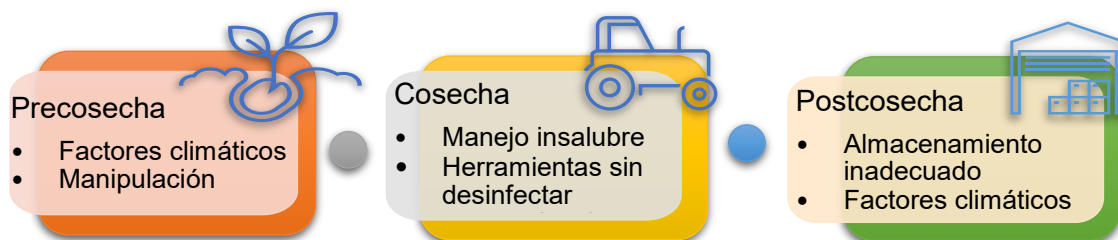
Además, la rotación de cultivos y la elección de variedades resistentes a plagas ayudan a reducir el riesgo de contaminación microbiológica (Code of Practice, 2002). Esto último implica la modificación de estos cultivos ya sea por cisgénesis, transgénesis o hibridación haciendo uso de herramientas como la edición genómica o la ingeniería genética (Kumar, 2020). No obstante, el cambio climático ha alterado el comportamiento de algunos hongos micotoxigénicos confiriéndoles nuevas capacidades como la colonización de nuevos entornos o huéspedes, así como la adaptación a condiciones que antes eran extremas para ellos (Smith & Casadevall, 2023) de manera que desarrollar plantas resistentes a una infección específica de hongos podría no ser una estrategia eficaz. Aunado a ello, el uso de cultivos agrícolas modificados genéticamente está prohibido en ciertos países debido a los posibles riesgos que podrían suponer para el medio ambiente y la salud humana (Gunasekaran, 2023).

Otro aspecto importante para implementar estrategias de prevención de contaminación de alimentos de origen agrícola es el papel de las organizaciones gubernamentales. Estos organismos son los encargados de implementar

normativas y regulaciones que obliguen a los productores a garantizar la seguridad alimentaria desde la producción hasta la venta al público. Las agencias reguladoras deben establecer y hacer respetar estándares estrictos para la producción, procesamiento y distribución de alimentos. La supervisión continua y las auditorías garantizan que se sigan correctamente las prácticas de seguridad alimentaria para la obtención de alimentos inocuos y que cualquier incumplimiento sea abordado de manera oportuna (Awuchi et al., 2022).

### 2.1.2 Etapas del procesamiento de alimentos vulnerables a la contaminación

Los alimentos de origen agrícola son propensos a la contaminación por agentes microbianos, como los hongos, en las etapas de su procesamiento lo que pone en riesgo su inocuidad. El proceso de producción de alimentos agrícolas se puede dividir en tres etapas: precosecha, cosecha y postcosecha ([Figura 2.3](#)) (Fiscal-Arjona, 2019).



**Figura 2.3-** Puntos críticos del procesamiento de alimentos agrícolas vulnerables a sufrir contaminación. Modificado de *J. Food Sci*, 83 (6), (2018).  
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181>



La etapa de la precosecha se refiere a todas aquellas actividades realizadas para obtener el alimento, esto incluye la preparación de las semillas, el cultivo y el mantenimiento de este. Uno de los productos agrícolas más comercializados en el mundo es el café. Suele ser producido por agricultores en diversos países y atraviesa diferentes etapas a lo largo de su recorrido desde el agricultor hasta el consumidor. Este producto puede enfrentar la contaminación por diversos hongos (Van der Stegen, 2003).

El cafeto (*Coffea*) es una planta que requiere mucha humedad para dar fruto y generalmente se cultiva en terrenos con altitudes entre los 1200 y 1950 m (Ferreira et al., 2019). Su vida media es de aproximadamente 30 años, de manera que puede enfrentar problemas climáticos como el déficit de agua, riesgo de heladas, temperaturas extremas, entre otros (Smith & Casadevall, 2023). Durante el cultivo, factores como la temperatura y la humedad pueden favorecer el crecimiento de hongos en el café como *Hemileia vastatrix* que provoca la caída prematura de las hojas, *Colletotrichum kahawae* que produce necrosis en el fruto del café (European Union, 2021).

En la fase de la cosecha las posibles fuentes de contaminación de alimentos con microorganismos tienen que ver con las malas prácticas agrícolas (Fiscal-Arjona, 2019). En el caso del café, en la etapa de la cosecha, el fruto maduro se recolecta manualmente de la planta y se coloca en cestas. Si no se realiza un lavado correcto

de manos, limpieza y desinfección de utensilios, las cerezas cosechadas podrían contaminarse (Borém & de Andrade, 2019).

Por último, las principales actividades involucradas con la etapa de la postcosecha se relacionan con el procesamiento y el almacenamiento. En el caso del café se aplican diversos procesos antes de ser almacenado y distribuido, tales como como el despulpado, el secado, la fermentación, el tostado, el molido, entre otros (Fiscal-Arjona, 2019). El secado es uno de los procesos postcosecha más susceptibles a la contaminación por estos hongos. Este proceso se puede realizar mediante dos métodos: el beneficio seco (o secado natural) y el beneficio húmedo. El secado natural consiste en secar la cereza entera después de su cosecha mientras que en el beneficio húmedo el proceso consiste en despulpar las cerezas, es decir, separar la pulpa de la cereza del grano y después colocar a secar el grano (Borém & de Andrade, 2019). La pulpa de la cereza del café es rica en nutrientes, principalmente carbohidratos. Aunado a ello, las condiciones climatológicas donde se realiza esta operación generalmente se caracterizan por una alta humedad y temperaturas entre 28 - 30 °C, todo ello genera un ambiente propicio para que proliferen los hongos como los productores de OTA (Bedimo et al., 2008).

Después del procesamiento, una de las operaciones más críticas en la etapa de la postcosecha es el almacenamiento. En el caso del café, los granos secos se almacenan en sacos colocados en tarimas en el suelo que debería estar seco; sin

embargo, la elevada humedad en donde se almacena puede permitir el crecimiento de los hongos ocratoxigénicos (European Union, 2021).

El mayor riesgo del crecimiento de hongos en alimentos agrícolas es su capacidad de producir micotoxinas, como la OTA. Para proponer estrategias que eviten o disminuyan el crecimiento de estos hongos, es importante comprender las características generales de las micotoxinas.

## 2.2 Micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios producidos por diversos tipos de hongos que pueden desarrollarse bajo condiciones particulares de humedad y temperatura en los alimentos (Venkatesh & Keller, 2019). Los metabolitos secundarios no participan directamente en el crecimiento, desarrollo o reproducción, pero ayudan a mantener el organismo en general, pues tienen papeles destacados en sus entornos ecológicos. Por ejemplo, las micotoxinas pueden actuar en papeles de defensa contra otros microorganismos como compuestos antimicrobianos o patogénicos (Venkatesh & Keller, 2019).

Las micotoxinas pueden constituir una amenaza para la salud de los seres humanos y de los animales debido a que poseen efectos negativos comprobados como la toxicidad en el hígado, en los riñones, supresión del sistema inmunológico e incluso algunas pueden ser carcinógenas (Li et al., 2023).

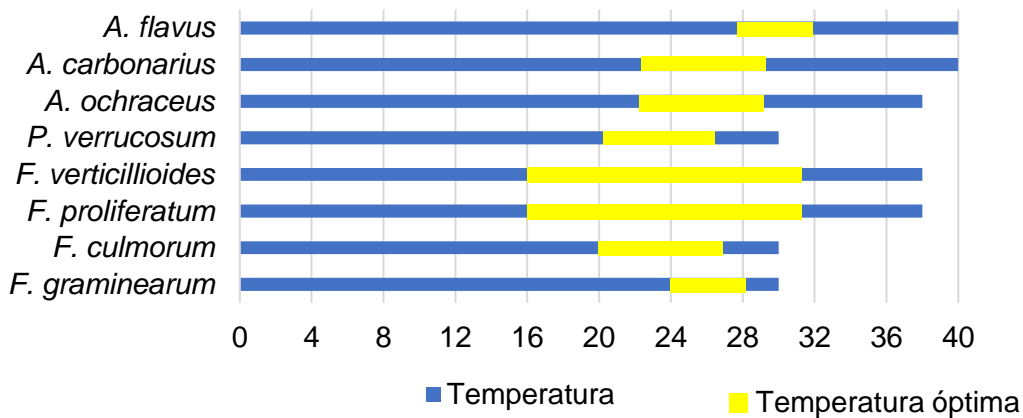
Se han identificado alrededor de 400 micotoxinas en la naturaleza; la mayoría tienen un peso molecular bajo (<700 Da), son químicamente estables y es muy difícil eliminarlas de los alimentos pues resisten a los procesos térmicos como el tostado y el secado (Liu et al., 2022). De la cantidad reportada de micotoxinas, solo algunas afectan la salud humana, entre las que podemos mencionar las aflatoxinas, la ocratoxina A (OTA), la zearalenona (ZEA), las fumonisinas ([Figura 2.5](#)), la patulina, el deoxinivalenol, el nivalenol, las toxinas de *Alternaria* y la citrinina (Yang et al., 2020).

### 2.2.1 Condiciones que favorecen el desarrollo de las micotoxinas

Las principales micotoxinas son producidas por los hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Alternaria* (Muhialdin & Saari, 2020). Estos hongos generalmente se desarrollan ya sea durante el periodo de crecimiento de los cultivos o durante su almacenamiento (Alshannaq & Yu, 2017). Esto depende en gran parte de las condiciones ambientales como la humedad, la temperatura, el daño causado por insectos y la sequía (Khaneghah et al., 2019). Asimismo, el pH, la composición química y la actividad del agua de los alimentos, juegan un papel importante en la presencia y concentración de micotoxinas (Khodaei et al., 2021).

El crecimiento de la mayoría de los hongos se favorece por las temperaturas cálidas y humedad relativa alta. Las zonas en donde generalmente se cultivan alimentos agrícolas son lugares tropicales y subtropicales donde predomina este tipo de ambientes con temperaturas entre 20 y 30 °C (Awuchi et al., 2022). Dichas

temperaturas, además, implican la producción de micotoxinas por los hongos. En la [Figura 2.4](#) se muestran las temperaturas óptimas en las que ciertos hongos producen micotoxinas.



**Figura 2.4** - Rango de temperaturas mínimo, óptimo y máximo (°C) para la producción de micotoxinas por diferentes hongos. Adaptado de *Fungal Reproduction and Growth*. IntechOpen, (2022). <https://doi.org/10.5772/intechopen.100207>

Hongos del género *Fusarium*, por ejemplo, a menudo infecta cultivos en crecimiento como el trigo, la cebada y el maíz cuando existen humedades relativas altas (90 a 100%) en el campo (Los et al., 2018) y con una temperatura que varía de los 16 a 30 °C. *Aspergillus*, en cambio, se asocia a cultivos que crecen en temperaturas más cálidas (26 - 32 °C). Las especies de *Aspergillus* son patógenos oportunistas que pueden crecer en condiciones previas a la cosecha de diferentes productos como el maíz, el algodón, la soya, la uva y las nueces, aunque la mayoría puede desarrollarse durante el procesamiento y almacenamiento en productos como el café, el cacao, los cacahuates, entre otros (Perrone & Gallo, 2017). Algunas especies pertenecientes al género *Penicillium* generalmente crecen en

temperaturas bajas y con baja actividad de agua. Invaden principalmente cereales almacenados, productos cárnicos como el salami y el jamón y algunas frutas como manzanas y peras (Perrone & Susca, 2017). Producen micotoxinas en un rango de 20 a 26 °C ([Figura 2.4](#)). Ciertas especies de *Alternaria* pueden crecer y acumular micotoxinas en frutas como pimientos, tomates, melones, mangos, frambuesas, además, en cereales como el trigo, la cebada y la avena ya sea en el campo o durante la postcosecha (Fernández & Patriarca, 2017).

Algunas especies de *Penicillium* y *Fusarium* tienen la capacidad de invadir las semillas antes de la cosecha y continuar creciendo incluso durante el almacenamiento (Khaneghah et al., 2019) sobre todo si existen condiciones como temperaturas de 25 a 30 °C, actividad de agua superior a 0.78 y humedad relativa de 88 a 95 % (Awuchi et al., 2022). En general, todos los cultivos y cereales que se almacenan incorrectamente durante un tiempo prolongado son susceptibles al crecimiento de hongos y a la posterior contaminación por micotoxinas (Wan et al., 2020).

### 2.2.2 Importancia de las micotoxinas en la salud humana

Las micotoxinas representan una seria amenaza para la salud humana, ya que tienen el potencial de desencadenar diversos efectos adversos en los seres humanos entre ellos la carcinogenicidad. La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) ha clasificado a las sustancias en cuatro grupos diferentes de acuerdo con el riesgo cancerígeno para

los seres humanos (1, 2A, 2B, 3 y 4) (IARC, 2012). La [Tabla 2.1](#) muestra las clasificaciones junto con las definiciones y algunos ejemplos de sustancias consideradas en dichas clasificaciones.

**Tabla 2.1** - Agentes clasificados por las monografías del IARC, volúmenes 1 a 136 y algunos ejemplos.

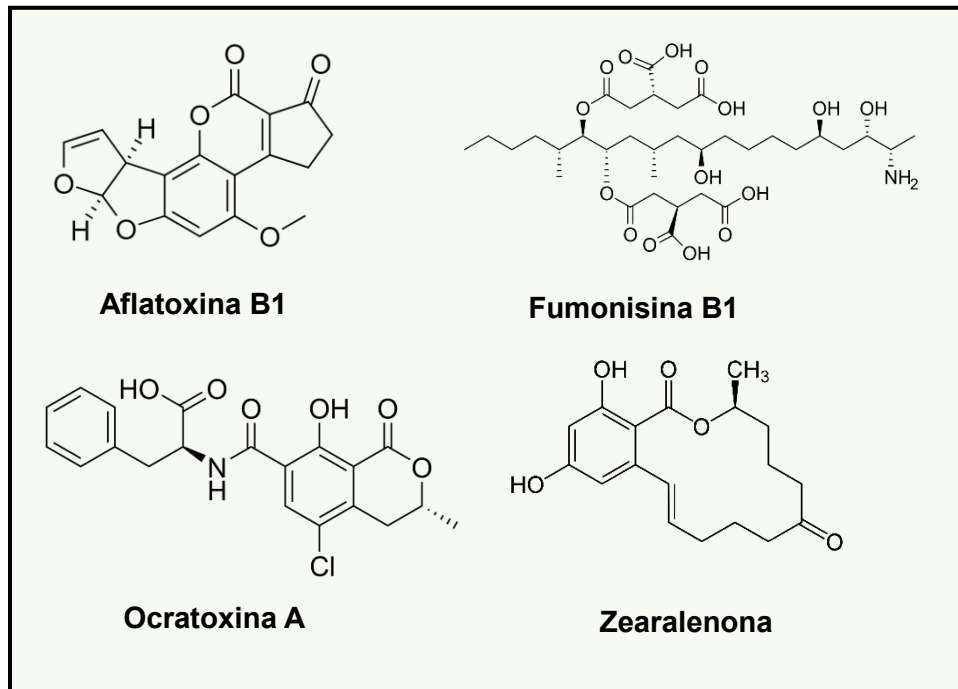
Clasificación	Definición	Ejemplos
Grupo 1	Carcinógeno para los humanos	Aflatoxina B1, nuez de areca, bencidina, terapia menopáusica con estrógeno y progestágeno, radiación ionizante.
Grupo 2A	Probablemente cancerígeno para los humanos	Esteroides androgénicos (anabólicos), compuestos de plomo, nitrato, glifosato.
Grupo 2B	Posiblemente cancerígeno para los humanos	Fumonisina B1, ocratoxina A, herbicidas clorofenoxi, gasolina.
Grupo 3	No clasificable en cuanto a su carcinogenicidad para los humanos	Zearalenona, deoxinivalenol, nivalenol, bisulfitos

La aflatoxina B1 (AFB1) está clasificada como carcinógeno del Grupo 1, como "carcinógeno para el ser humano", con altos riesgos de carcinoma hepatocelular, mientras que la fumonisina B1 (FUMB1) y la OTA están incluidas en el Grupo 2B definido como "probablemente carcinógeno para el ser humano". La ZEA se encuentra clasificada en el Grupo 3 definido como "no puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano"; aunque se ha asociado con el desarrollo de células de cáncer de mama (Ostry et al., 2017).

Algunos efectos adversos que pueden provocar las micotoxinas en los humanos son problemas teratogénicos, hepatotóxicos, mutagénicos e inmunosupresores (Alshannaq & Yu, 2017). Por ejemplo, las aflatoxinas se han asociado con síntomas como vómitos, dolor abdominal, edema pulmonar y cerebral, coma, convulsiones e incluso la muerte (Yang et al., 2020); mientras que la ZEA puede desencadenar alteraciones en el sistema reproductivo (Murtaza et al., 2022). Por otro lado, las fumonisinas pueden causar toxicidad en riñón e hígado (Yang et al., 2020) y la OTA posee efectos asociados con el desarrollo fetal y el sistema inmunológico (Malir et al., 2016).

Los impactos perjudiciales de las micotoxinas en la salud humana pueden estar relacionados principalmente con su estructura química ([Figura 2.5](#)) pues muchas de ellas poseen características que les permiten unirse a macromoléculas celulares como ácidos nucleicos y nucleoproteínas (Alshannaq & Yu, 2017). Además, algunas de estas estructuras son similares a ciertos metabolitos humanos como los estrógenos (siendo el caso de ZEA) lo cual facilita su unión a los sitios receptores estrogénicos (Murtaza et al., 2022). Las fumonisinas guardan similitudes con la esfinganina, por lo que perturba el metabolismo de los esfingolípidos y la OTA tiene un parecido estructural con la fenilalanina, de modo que interrumpe la actividad de la fenilalanina hidroxilasa en el riñón y el hígado, lo que lleva a la inhibición de la síntesis adecuada de ADN, ARN y proteínas (Alshannaq & Yu, 2017).





**Figura 2.5** - Estructura química de las principales micotoxinas que afectan la salud humana. (Fuente: [www.chemdraw.com](http://www.chemdraw.com))

Las estructuras químicas de las micotoxinas no solo confieren facilidad para ingresar e interactuar en el cuerpo humano, sino que les otorgan estabilidad y resistencia a las micotoxinas (Wan et al., 2020). Algunas de ellas como la AFB1, la FUMB1, la OTA y la ZEA son resistentes a la degradación durante el procesamiento de alimentos contaminados con las mismas, como la molienda, el calentamiento o la extrusión (Murtaza et al., 2022). La OTA posee una estructura compuesta por la integración de moléculas de la familia de las dihidrocoumarinas con moléculas de la  $\beta$ -fenilalanina (Figura 2.5). Contiene un átomo de cloro ubicado en el anillo de la isocoumarina, en posición *meta* respecto a la  $\beta$ -fenilalanina lo cual le confiere una alta estabilidad por lo que tiene una vida media larga, así puede bioacumularse y biomagnificarse a lo largo de la cadena trófica (Melvin et al., 2021).

La Comisión Europea (CE) ha establecido niveles máximos permitidos para la mayoría de las micotoxinas en los alimentos mediante el Reglamento de la Comisión CE número 2023/915, en el que se recomiendan los métodos de muestreo y análisis para prevenir o minimizar su producción y proteger la salud humana (European Commission, 2023). La [Tabla 2.2](#) muestra las micotoxinas de mayor importancia por sus efectos con respecto a la salud, algunos productos alimenticios comúnmente contaminados y los límites regulatorios para los niveles de micotoxinas en alimentos y piensos para animales.

**Tabla 2.2** - Contenido máximo de micotoxinas en productos alimenticios de acuerdo con el Reglamento (CE) no 2023/915 de la Comisión del 25 de abril de 2023 del Parlamento Europeo y del Consejo.

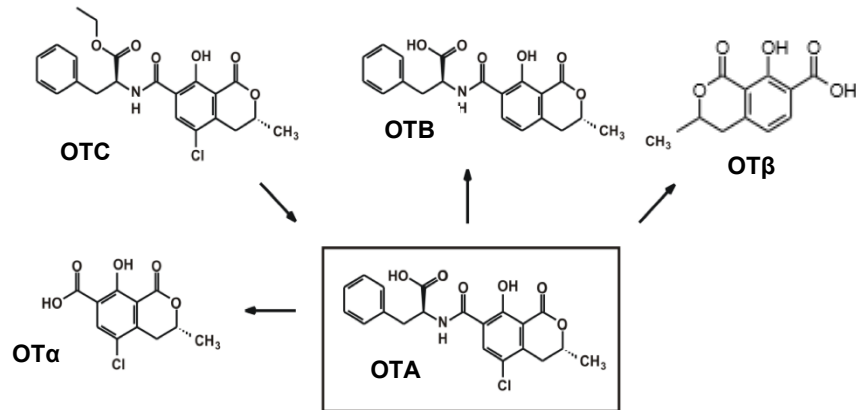
Micotoxina	Alimento	Dosis máxima (µg/kg)
<b>Alflatoxina B1</b>	Cacahuates y oleaginosas	2
	Almendras, pistaches y huesos de albaricoque	8
	Avellanas y nueces de Brasil	5
	Cereales y productos a base de cereales	2
	Maíz y arroz	5
	Espicias ( <i>Capsicum</i> spp., <i>Piper</i> spp., <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada) <i>Zingiber officinale</i> (jengibre) <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma)	5
	Jengibre ( <i>Zingiber officinale</i> )	5
<b>Ocratoxina A</b>	Cereales no procesados	5
	Derivados de cereales no elaborados	3
	Frutos secos de vid (grosellas, pasas y sultanas) e higos secos	8
	Café tostado en grano y café tostado molido	3
	Café soluble (instantáneo)	5
	Vino (excepto espumoso), vino de frutas y jugo de uva	2
	Alimentos para lactantes	0.5
<b>Zearalenona</b>	Espicias ( <i>Piper</i> spp., <i>Myristica fragrans</i> (nuez moscada), <i>Zingiber officinale</i> (jengibre), <i>Curcuma longa</i> (cúrcuma), <i>Capsicum</i> spp.	15 - 20
	Cereales no elaborados (excepto maíz)	100
	Maíz no elaborado	350
	Cereales para consumo humano	75
	Pan, pasteles, galletas a base de maíz	50
	Maíz para consumo humano	100
	Alimentos para bebés y alimentos procesados a base de cereales para lactantes y niños pequeños	20
<b>Fumonisinias (B1 + B2)</b>	Maíz no elaborado	4000
	Maíz y derivados para consumo humano	1000
	Cereales de desayuno a base de maíz y snacks a base de maíz	800
	Alimentos a base de maíz para lactantes	200

El contenido máximo de micotoxinas en diferentes alimentos se estableció en niveles estrictos que se puedan obtener al aplicarse buenas prácticas agrícolas y de producción y con base en el riesgo relacionado con el consumo del alimento. Los contaminantes que son considerados cancerígenos genotóxicos, como las aflatoxinas y aquellos en los que la exposición actual de la población se aproxime o supere la ingesta tolerable, como las ocratoxinas, se han fijado límites máximos más estrictos. De esta manera, se garantiza que los productores de alimentos apliquen medidas para prevenir y reducir la contaminación por micotoxinas, con el fin de proteger la salud pública. Sin embargo, de acuerdo con la nueva información disponible sobre el riesgo de consumo de las micotoxinas en la salud humana, es necesario actualizar el valor del contenido máximo de ciertas micotoxinas (European Commission, 2023).

### 2.2.3 Ocratoxina A

Las ocratoxinas comprenden un grupo de micotoxinas producidas por varias especies de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*, hongos que prevalecen en climas tropicales y templados, respectivamente. Se pueden dividir en tres grupos (A, B y C) en base a su grupo funcional característico. La ocratoxina A (OTA), el derivado fenilalanino de una isocumarina sustituida ([Figura 2.5](#) y [Figura 2.6](#)), es el miembro más tóxico de la familia, pues posee un grupo cloro en la molécula (Meulenberg, 2016). En la [Figura 2.6](#) se presentan las estructuras de la OTA y sus derivados. La ocratoxina B (OTB) es un tipo de ocratoxina que carece del átomo de cloro, la ocratoxina C (OTC) es una forma de éster etílico de OTA, la ocratoxina  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) es

una forma de isocumarina de OTA y la ocratoxina  $\beta$  (OT $\beta$ ) es una forma de OT $\alpha$  que carece del átomo de cloro (Melvin et al., 2021; Meulenbergh, 2016).



**Figura 2.6** - Estructuras químicas de la OTA y sus derivados. Adaptado de: *Toxins* 2016, 8, 111. <https://doi.org/10.3390/toxins8040111>

Se ha reportado la presencia de la OTA en diversos productos agrícolas como los cereales y sus subproductos: el café, los granos de cacao y el chocolate; las especias, los productos cárnicos, la cerveza, el vino, las frutas frescas y las deshidratadas, los jugos de frutas, los frutos secos, las uvas, los productos lácteos y las fórmulas infantiles. La mayoría de estos productos están directamente sujetos a contaminación primaria en el campo y durante la postcosecha (Ben Miri et al., 2024; Lee et al., 2024; Malir et al., 2016).

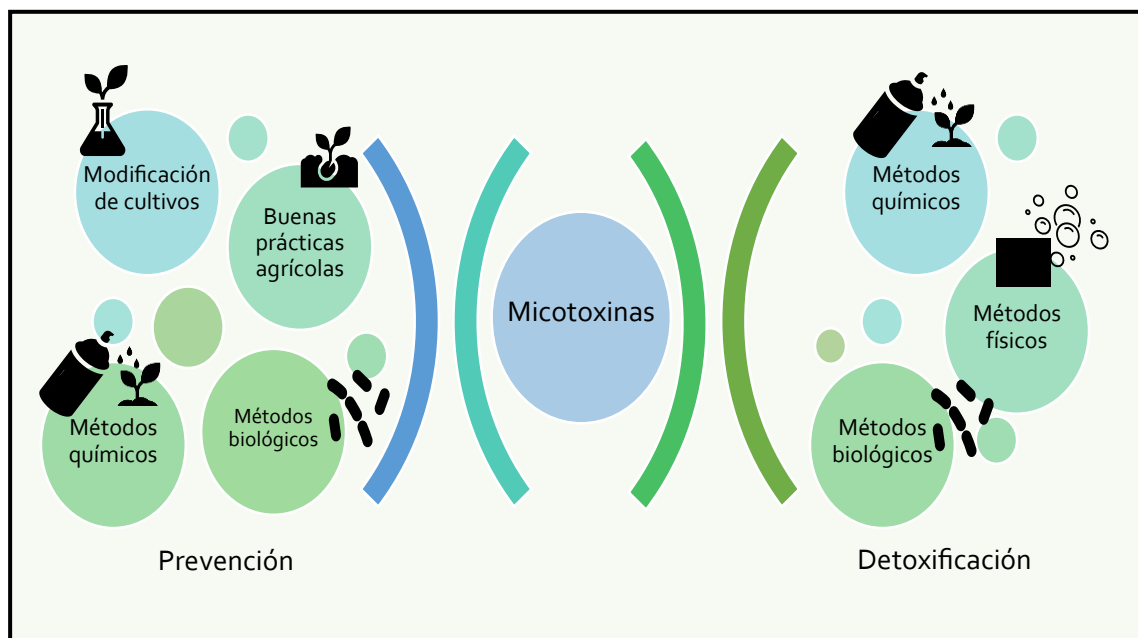
La OTA es muy estable en condiciones ácidas y temperaturas elevadas, conserva su estabilidad hasta 250 °C por lo que se ha detectado en muchos productos alimenticios debido a que las condiciones a las que son sometidos los alimentos

procesados no modifican su presencia en el producto (Alshannaq & Yu, 2017; Melvin et al., 2021).

El daño que puede causar la OTA en el cuerpo humano se debe a su parecido estructural con la fenilalanina. En consecuencia, la OTA interrumpe la actividad de la fenilalanina hidroxilasa en el riñón y el hígado, lo que lleva a la inhibición de la síntesis adecuada de ADN y, por consecuencia, ARN y proteínas (Alshannaq & Yu, 2017). Otros efectos negativos asociados a la salud son daños durante el desarrollo fetal y en el sistema inmunológico. Es cancerígena en los riñones y el hígado, en estudios con ratas, se ha encontrado que la OTA induce daño y tumores renales (Malir et al., 2016).

Debido a los efectos negativos que puede tener la OTA en los humanos se ha propuesto implementar buenas prácticas de manufactura para disminuir la incidencia de OTA en los alimentos que llegan a los consumidores (Wang et al., 2022), así como estrategias para eliminar o descontaminar a la OTA con métodos químicos y biológicos.

Algunas estrategias de prevención de crecimiento microbiológico en alimentos agrícolas, aplicables al crecimiento de hongos ocratoxigénicos, se han discutido en la Sección 2.1.1. En la [Figura 2.7](#) se resumen estrategias generales de prevención y detoxificación de micotoxinas. En esta sección se discutirán medidas de descontaminación o detoxificación de micotoxinas.



**Figura 2.7** - Principales métodos de prevención y detoxificación de micotoxinas.  
Fuente: elaboración propia.

#### 2.2.4 Métodos físicos, químicos y biológicos de detoxificación de micotoxinas

En ocasiones resulta casi imposible prevenir o controlar la proliferación de hongos productores de micotoxinas; aunado a ello, la estabilidad de ciertas micotoxinas dificulta su eliminación durante el procesamiento de alimentos durante los diferentes procesos utilizados en la cocción, ya sea hervido, horneado, freído, asado y pasteurizado (Alshannaq & Yu, 2017). En el caso de las aflatoxinas, se han detectado en algunos productos lácteos, como el queso, son estables al calor y son capaces de unirse a la caseína (Wang et al., 2023). No así para la zearalenona ya que es estable a temperaturas de cocción normales y se elimina parcialmente a altas temperaturas (Murtaza et al., 2022). A diferencia de las fumonisinas, cuyas las propiedades hidrofílicas permiten su acumulación en los tejidos sea mínima y no se

detectan en productos lácteos (Li et al., 2022); aunque se ha reportado que la fumonisina B1 es relativamente estable al calor (Arumugam et al., 2021). Una de las micotoxinas más estables es la OTA ya que se ha demostrado que presenta una alta estabilidad en ambientes ácidos, puede resistir procesos térmicos intensos y resulta difícil de eliminar de los alimentos durante la cocción normal (Lee et al., 2024; Melvin et al., 2021).

En estos casos, es recomendable aplicar estrategias para la detoxificación o descontaminación de las micotoxinas empleando métodos químicos, físicos y/o biológicos ([Figura 2.7](#)). Algunos métodos químicos se basan en el uso de ozono, radiación ultravioleta o gamma, agentes acidificantes, antioxidantes o soluciones alcalinas; no obstante, algunos de estos materiales pueden perjudicar el valor nutricional y las características organolépticas del alimento (Han et al., 2022).

Las técnicas físicas involucran el uso de materiales con capacidades adsorbentes de micotoxinas como el carbón activado, nanomateriales, óxido de grafeno y los silicatos (Liu et al., 2022); sin embargo, algunos de estos materiales presentan baja especificidad contra algunas micotoxinas, más aún, pueden unirse a los micronutrientes de los alimentos reduciendo su valor nutricional (Adebo et al., 2021).

Entre los métodos biológicos se encuentra el biocontrol con microorganismos inoocuos como las BAL. A diferencia de las técnicas físicas y químicas, los enfoques biológicos suelen ser más seguros, eficientes y amigables con el medio ambiente,



emergiendo como una estrategia prometedora para la desintoxicación de micotoxinas.

## 2.3 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo amplio de bacterias que son “generalmente reconocidas como seguras” (GRAS, por sus siglas en inglés), para aplicarlas en alimentos de consumo humano, entre otras aplicaciones (Narvhus & Axelsson, 2003). Tienen una distribución en la naturaleza determinada por sus exigencias nutricionales ligadas a sus limitadas actividades biosintéticas. Se han encontrado en la naturaleza en materia vegetal y animal sin procesar, así como en diversos alimentos fermentados. Además, se ha reportado que forman parte de la microbiota del tracto gastrointestinal y urogenital de humanos y animales (Giraffa, 2014).

Han sido consideradas tradicionalmente como una extensa familia de bacterias estrechamente vinculadas por la producción de ácido láctico a través del catabolismo de carbohidratos, aunque esta agrupación no se basa en un concepto taxonómico (Carr et al., 2002).

### 2.3.1 Clasificación de las bacterias ácido lácticas

Los primeros análisis taxonómicos de BAL se centraron en atributos fenotípicos, tales como las características del metabolismo de carbohidratos, el desarrollo en

diversos medios de cultivo, la temperatura y el pH de crecimiento (Orla-Jensen, 1919). Gracias a la aplicación tecnologías de secuenciación de alto rendimiento y bioinformática se ha simplificado el análisis genómico de poblaciones, para dar mayor claridad a su taxonomía (Kowalczyk et al., 2015). Para simplificar los estudios funcionales y ecológicos de estas bacterias, se procedió a una nueva reclasificación utilizando diversos enfoques, que incluyen la filogenia del genoma central, la identidad de los aminoácidos, los genes distintivos y las características fisiológicas y ecológicas (Zheng et al., 2020).

En la actualidad se reconocen 6 familias y 40 géneros. Las diferentes familias incluyen *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* (Lahtinen et al., 2012). La familia *Lactobacillaceae* destaca por su gran número de especies (150), con alrededor de 300 subtaxones. Esta familia contiene los géneros *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y *Pediococcus* (Li et al., 2023).

Debido a la aplicación de las más recientes técnicas de identificación molecular se ha podido reubicar a los siguientes 25 géneros: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus*, *Holzapfelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Lacticaseibacillus*, *Latilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Liquorilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Paucilactobacillus*,

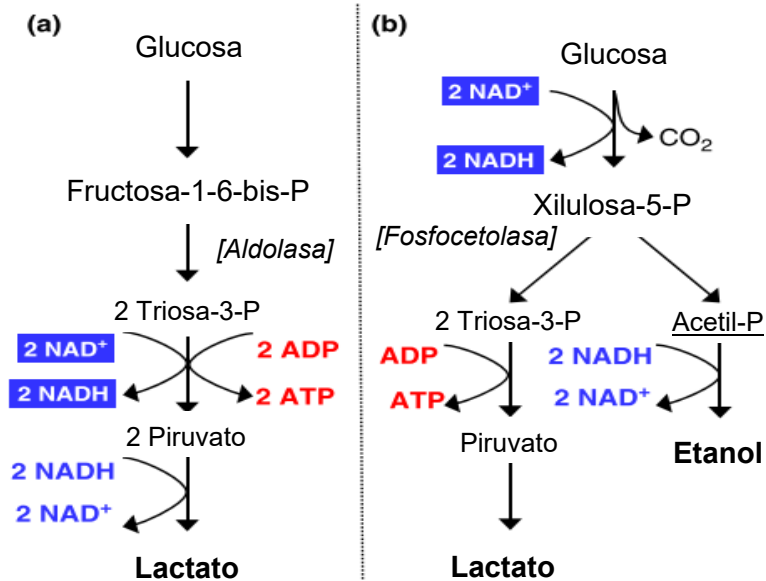


Las ramas de cada miembro del mismo grupo filogenético están indicadas con el mismo color, el tipo de cepa de cada grupo se encuentra en negrita. Los hábitats naturales relacionados con cada especie están delimitados con los anillos exteriores, el anillo de gradientes rojos refleja el contenido de GC (fracción guanina-citosina) de cada secuencia del genoma; el más claro representa menor contenido de GC y los círculos sólidos en verde indican el tamaño de GC (Zheng et al., 2020).

Los microorganismos del género *Lactobacillus* son Gram positivos, anaerobios facultativos y no formadores de esporas. Las células son bacilares, pueden formar cadenas, pares o tétradas. Los homofermentativos, metabolizan las hexosas a través de la vía de Embden-Meyerhoff a piruvato y acetilfosfato como intermediarios principales, con ácido láctico como principal producto ([Figura 2.9](#)). Los heterofermentativos, metabolizan las hexosas a través de la vía de fosfoetolasa a piruvato y acetilfosfato como intermediarios principales (Gänzle, 2015).

### 2.3.2 Requerimientos nutricionales

El crecimiento de las BAL, al igual que cualquier organismo, está influenciado por condiciones operacionales como la temperatura, el pH, la actividad de agua, la presencia de nutrientes como los minerales, los aminoácidos, las vitaminas y los carbohidratos. Las BAL presentan una limitada actividad biosintética por lo que tienen requerimientos nutricionales complejos de aminoácidos, péptidos, derivados de ácidos nucleicos, vitaminas, sales, ácidos grasos o ésteres de ácidos grasos y carbohidratos fermentables (Saeed & Salam, 2013).



**Figura 2.9** - Rutas bioquímicas de la transformación de glucosa. (a) Metabolismo homofermentativo a través de la vía de Emden-Meyerhoff. (b) Metabolismo heterofermentativo a través de la vía de la fosfocetolasa. Adaptado de *Curr. Opin. Food Sci. 2*, (2015). <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.03.001>.

En el caso de las BAL homofermentativas la disponibilidad de sustratos y oxígeno determinan el destino del piruvato, ya que este último es el punto de ramificación principal del metabolismo homoláctico de las hexosas ([Figura 2.9](#)). Cuando hay una gran cantidad de carbohidratos fermentables, el lactato es el principal producto del metabolismo de la mayoría de las BAL que crecen aeróbicamente (Gänzle, 2015). En teoría, la fermentación homoláctica produce dos moles de adenosín trifosfato (ATP) por mol de glucosa consumida (Lahtinen et al., 2012).

La mayoría de las BAL heterofermentativas se desarrollan mejor en presencia de los disacáridos; sin embargo, cuando hay monosacáridos en el medio como la fructosa se reducen preferencial o exclusivamente a manitol (Gänzle, 2015). En estas BAL el acetilfosfato es el punto de ramificación central del metabolismo ([Figura](#)

2.9) y el rendimiento teórico por glucosa consumida es de un mol de ATP cuando el fosfato de acetilo formado como intermediario se reduce a etanol. Por otro lado, si el fosfato de acetilo se convierte en ácido acético en presencia de aceptores de electrones alternativos, se forma un ATP adicional (Lahtinen et al., 2012).

Por otro lado, otro aspecto a destacar del metabolismo de estos microorganismos es que muchas BAL no pueden sintetizar aminoácidos de fuentes de nitrógeno inorgánico, por lo tanto, dependen de los aminoácidos disponibles en el medio de cultivo, como cisteína, ácido glutámico, isoleucina, leucina, prolina y valina (Fernández & Zúñiga, 2006; Vinderola et al., 2019).

La síntesis de proteínas, la generación de energía metabólica o potencial redox y la resistencia al estrés oxidativo son solo algunas de las muchas funciones de la cisteína. La prolina por otro lado puede estabilizar las proteínas intracelulares y evitar su pérdida al disminuir la acidez del medio y eliminar el oxígeno en condiciones de estrés (Pedersen et al., 2012). El ácido glutámico funciona como un intermediario clave en el metabolismo de aminoácidos de las BAL, mientras que los aminoácidos ramificados como la isoleucina, leucina y valina juegan un papel importante en la regulación de la proteólisis de algunas BAL (Fernández & Zúñiga, 2006).

Las fuentes de nitrógeno orgánico proveen de aminoácidos a las BAL, entre ellas se pueden usar el extracto de levadura, la triptona, las peptonas de origen animal,

el extracto de carne, el jarabe de maíz, los extractos de hígado, el suero de quesería, los hidrolizados de proteínas, entre otros (Coghetto et al., 2016; Juárez-Tomás et al., 2010; Manzoor et al., 2017).

Las BAL también tienen requerimientos de vitaminas y minerales, como la tiamina, la biotina, el ácido pantoténico, la riboflavina y el ácido nicotínico. La importancia de la disponibilidad de estas vitaminas radica en que actúan como cofactores de enzimas asociadas a la vía de las pentosas fosfato, es decir, actúan como un factor estimulador o esencial para el crecimiento de algunas BAL (Saeed & Salam, 2013).

En cuanto a las necesidades de minerales, algunas BAL no pueden crecer sin iones metálicos como el  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $K^+$  y  $Na^+$ , debido a que algunos de estos iones están involucrados como cofactores de enzimas implicadas en el transporte de membrana o como componentes de complejos estructurales (Matevosyan et al., 2019).

El medio De Man, Rogosa y Sharpe (MRS) es uno de los medios de cultivo más utilizados para el crecimiento de las BAL, es un medio rico en nutrientes que son aportados por el extracto de levadura, el extracto de carne y la peptona, fuentes principales de nitrógeno, aminoácidos, carbono, además de minerales y vitaminas (De Man, et al., 1960); sin embargo, es un medio de cultivo costoso. Se han realizado diferentes estudios para modificar la composición de este medio y

disminuir los costos de producción (Gao et al., 2009; Liu et al., 2010; Reddy et al., 2016).

En un trabajo previo se formuló un medio de cultivo con base en la composición del medio MRS. Por medio de diseños experimentales se optimizó la concentración del acetato de sodio y el sulfato de magnesio; las fuentes de nitrógeno, extracto de carne y peptona de carne, fueron sustituidas por una fuente más económica, el extracto de germen de malta (EGM). El resultado fue un medio de cultivo optimizado denominado MEGM, que soporta un crecimiento de las BAL comparable al que se obtiene en el medio MRS y es 30 % más económico. Para confirmar estos resultados, se realizaron simulaciones del crecimiento y formación de ácido láctico (AL) con ayuda del modelo logístico acoplado a Luedeking-Piret para evaluar la similitud entre las cinéticas de crecimiento entre el medio MRS y el medio MEGM (Domínguez-Gutiérrez et al., 2023a). El uso de modelos cinéticos para predecir el crecimiento de un cultivo bacteriano apoya el establecimiento de estrategias de seguimiento de cultivos microbiológicos para la obtención de biomasa o metabolitos de interés (Taiwo et al., 2024); así como para la comparación entre cepas, la automatización, control y selección de bioprocesos (Deseure et al., 2021).

### 2.3.3 Aplicaciones de las bacterias ácido lácticas

Se ha documentado que las primeras fermentaciones de alimentos datan de 7000 años antes de cristo (a.C.) (Mannaa et al., 2021). Desde entonces las BAL han sido empleadas en la elaboración de alimentos fermentados. En la actualidad se han



reportado otros usos como vectores de vacunas y para control biológico. La [Tabla 2.3](#) muestra algunos ejemplos de las principales aplicaciones de las BAL.

**Tabla 2.3.-** Principales aplicaciones de BAL. (Modificado de *Dairy*, 1(3), 2020.; <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>).

Aplicación de BAL	Cepa empleada
Elaboración de kéfir	<i>L. kefir</i> , <i>L. kefiranofaciens</i> , <i>L. kefirgranum</i>
Elaboración de tofu	<i>L. plantarum</i>
Elaboración de koumiss	<i>L. spp.</i>
Elaboración de kimchi	<i>L. plantarum</i>
Elaboración de embutidos fermentados	<i>L. sakei</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i>
Elaboración de vino de arroz	<i>L. sakei</i> , <i>P. acidilactici</i>
Conservación de encurtidos	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lc. pseudomesenteroides</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. pentosus</i>
Vectores de vacunas	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>L. spp.</i>
Iniciadores de cultivos para alimentos de ganado	<i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ,
Control biológico	<i>L. rhamnosus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. bifidum</i>

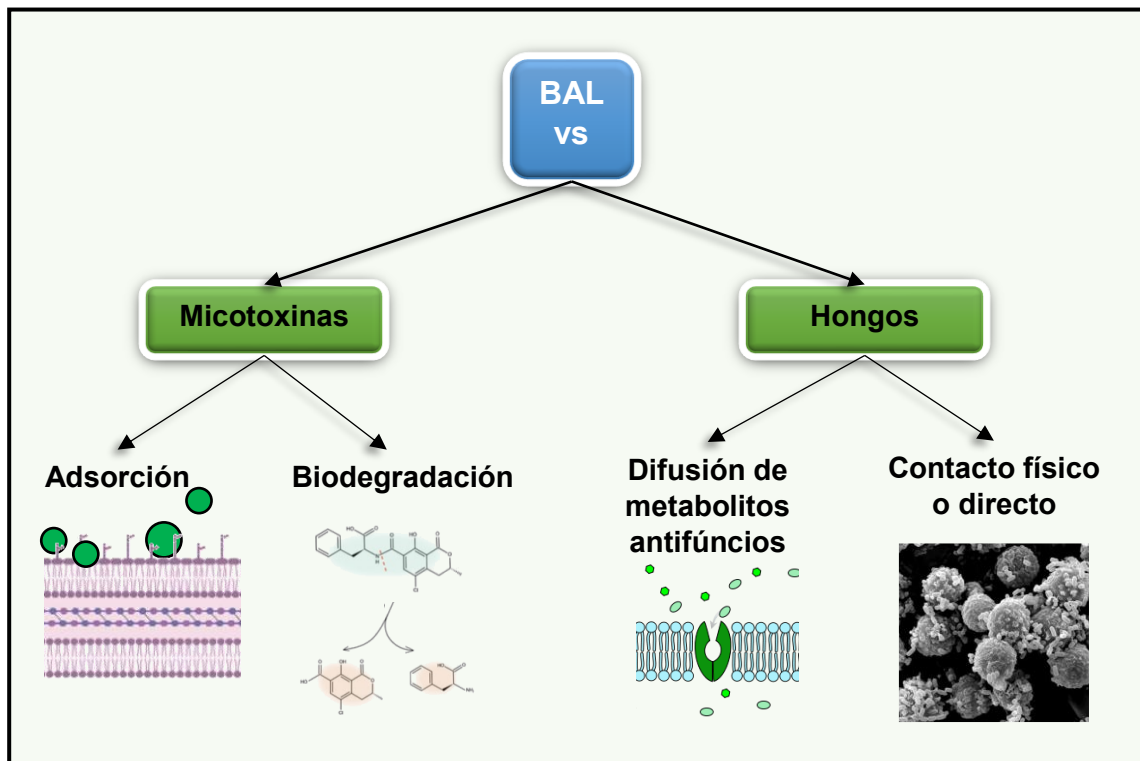
La principal aplicación de las BAL es en el procesamiento de alimentos y bebidas fermentadas, como kéfir, quesos, leches fermentadas, encurtidos, vegetales, entre otros ([Tabla 2.3](#)) donde contribuyen a mejorar su sabor, textura y calidad nutricional al producir una gran variedad de moléculas entre las que se encuentran el

acetaldehído, el diacetilo, la acetoína y el butanodiol, que son compuestos aromáticos típicos de muchos productos lácteos fermentados (Mozzi, 2015; Wang et al., 2021). Además, se ha demostrado que en los alimentos fermentados producen una serie de sustancias que benefician a la salud, entre las que se encuentran los antioxidantes, que tienen la capacidad de eliminar los radicales libres que contribuyen al envejecimiento (Wang et al., 2021).

Algunas BAL actúan como probióticos, al brindar beneficios a los consumidores que van más allá de su valor nutricional (Ayivi et al., 2020) ya que su presencia en el tracto digestivo equilibra la microbiota intestinal, lo que impacta de manera positiva el sistema inmune y evita que los microorganismos patógenos se adhieran a la pared intestinal (Ayivi et al., 2020). En la actualidad, otras BAL se han empleado en otras áreas, como portadoras de vacunas, para la síntesis de compuestos funcionales específicos, como iniciadores de cultivos en formulaciones microecológicas para alimentos de ganado, entre otros (Vinderola et al., 2019).

Las BAL también se han utilizado para preservar los alimentos, ya que intervienen en el control de las poblaciones microbianas en los alimentos fermentados debido a su producción de compuestos antifúngicos y antibacterianos, como ácidos carboxílicos, ácidos grasos, etanol, bacteriocinas, entre otros compuestos, de tal manera que pueden extender la vida de anaquel y contribuir a la inocuidad del producto (Varsha & Nampoothiri, 2016).

Otra aplicación muy importante de las BAL es como agentes de biocontrol. El biocontrol o control biológico es una estrategia que utiliza microorganismos inocuos y/o sus metabolitos para inhibir el crecimiento y la proliferación de microorganismos patógenos (Bangar et al., 2022). Las BAL han sido utilizadas como agentes de biocontrol debido a su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos en los alimentos a través de diferentes mecanismos (Figura 2.10) entre los que se encuentran la producción de metabolitos antifúngicos, entre los que se encuentran ciertos ácidos orgánicos, sustancias proteicas y compuestos volátiles que pueden afectar el crecimiento y la producción de toxinas de los hongos (Li et al., 2023).



**Figura 2.10** - Mecanismos de interacción de BAL vs hongos. Modificado de: *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 18(5), (2019). <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>

Contra los hongos, las BAL pueden actuar produciendo metabolitos como los ácidos orgánicos en su forma protonada o no disociada. La mayoría son de naturaleza lipofílica lo que les confiere la capacidad de difundirse fácilmente a través de la membrana celular de los hongos y acumularse en el citoplasma (Sadiq et al., 2019), en donde liberarán protones para provocar el colapso del gradiente electroquímico y su muerte (Schnürer & Magnusson, 2005). Algunos ácidos orgánicos producidos por las BAL capaces de producir estos efectos son el ácido acético, el propiónico, el láctico, el poliláctico y el fenil-láctico (Gänzle, 2015).

Otras moléculas producidas por las BAL con capacidades antifúngicas son los péptidos. Son compuestos formados por varios aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos, de bajo peso molecular y con altos índices de hidrofobicidad lo que les confiere la capacidad de difundirse en la membrana celular de los hongos (Li et al., 2023). Algunos de estos compuestos interactúan directamente con la superficie del hongo y alteran su pared celular al provocar la disipación del gradiente de protones (Siedler et al., 2019). Muchos de los metabolitos de naturaleza proteica no han sido caracterizados debido a la dificultad de purificación, pero suelen tener pesos entre 1-2000 kDa (Schnürer & Magnusson, 2005; Siedler et al., 2019).

Se ha demostrado que el efecto antifúngico se debe principalmente a un efecto sinérgico y/o aditivo entre los metabolitos producidos por las BAL que muestran un efecto inhibitor sólo al estar presentes ciertos compuestos al mismo tiempo (Schnürer & Magnusson, 2005).

Se ha reportado que algunas especies de BAL pueden disminuir la toxicidad de las micotoxinas en un proceso de detoxificación ([Figura 2.10](#)). Los procesos involucrados en la detoxificación de micotoxinas incluyen la degradación química/enzimática, conversiones metabólicas y procesos de adsorción a través de la membrana celular siendo este último el mecanismo más común de eliminación de micotoxinas por parte de las BAL (Bangar et al., 2022).

La biodegradación alude a la transformación de las micotoxinas en metabolitos menos tóxicos o no tóxicos mediante procesos biológicos (Liu et al., 2022). El principal mecanismo relacionado con la biodegradación de las micotoxinas se realiza por las enzimas microbianas. Por ejemplo, la OTA podría degradarse mediante la hidrólisis del grupo amida a OT $\alpha$  y fenilalanina, compuestos no tóxicos (Li et al., 2023). La ZEA puede biodegradarse a  $\alpha$ -zearalenol ( $\alpha$ -ZOL) y  $\beta$ -zearalenol ( $\beta$ -ZOL) que son formas menos tóxicas (Bangar et al., 2022).

Otro mecanismo implicado en la detoxificación de micotoxinas es la adsorción. La adsorción se define como la fijación de micotoxinas por células bacterianas en la pared celular mediante distintos tipos de interacciones (Wang et al., 2022). La pared celular de las BAL contiene peptidoglicano rodeado por una membrana citoplásmica, formada por polisacáridos, proteínas, ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos que pueden interactuar con las micotoxinas por procesos electrostáticos o interacciones no covalentes como los enlaces de hidrógeno e interacciones de Van der Waals (Sadiq et al., 2019).

Finalmente, las BAL constituyen una estrategia de biocontrol destinada a evitar el desarrollo de hongos, al mismo tiempo que disminuyen el riesgo de la presencia de micotoxinas a través de procesos como la inhibición de su producción, el secuestro y la biotransformación con el fin de contribuir a la extensión de la vida útil y aumentar la seguridad de los alimentos.

### 3 ► Justificación

La atención sobre la seguridad alimentaria es fundamental debido a la presencia de agentes patógenos, como bacterias, hongos y virus que pueden afectar la calidad e inocuidad de los alimentos, poniendo en riesgo la salud humana (Alshannaq & Yu, 2017). El principal peligro asociado con la presencia de los hongos micotoxigénicos en los alimentos es la producción de sus metabolitos secundarios, que tienen efectos diversos perjudiciales para la salud, con la potencial generación de cáncer como uno de los más significativos (Stoev, 2022). En consecuencia, es necesario el desarrollo de métodos seguros y eficaces para el control de microorganismos patógenos, para mejorar o reemplazar los métodos químicos y físicos existentes (Abraham et al., 2022). Para abordar este desafío, el uso de microorganismos seguros como estrategia de biocontrol resulta una alternativa que brinda ventajas de un menor daño hacia el medio ambiente y mayor seguridad para el consumidor (Varsha & Nampoothiri, 2016). Las BAL han sido utilizadas como agentes de biocontrol contra patógenos, por lo que representan una alternativa biológica para inhibir el crecimiento de hongos en los alimentos o bien para descontaminar alimentos con micotoxinas (Punia et al., 2022). De ahí que resulta crucial encontrar métodos simples y económicos para cultivar BAL con el fin de hacer más accesible su empleo.

## 4 ► Hipótesis

Las BAL aisladas de pulpa de café y cultivadas en un medio formulado con un extracto de germen de malta (MEGM) serán capaces de inhibir el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* Ac 089 y reducir la concentración de ocratoxina A (OTA) mediante la biotransformación o secuestro de la micotoxina.



## 5 ▶ Objetivos

### 5.1 Objetivo General

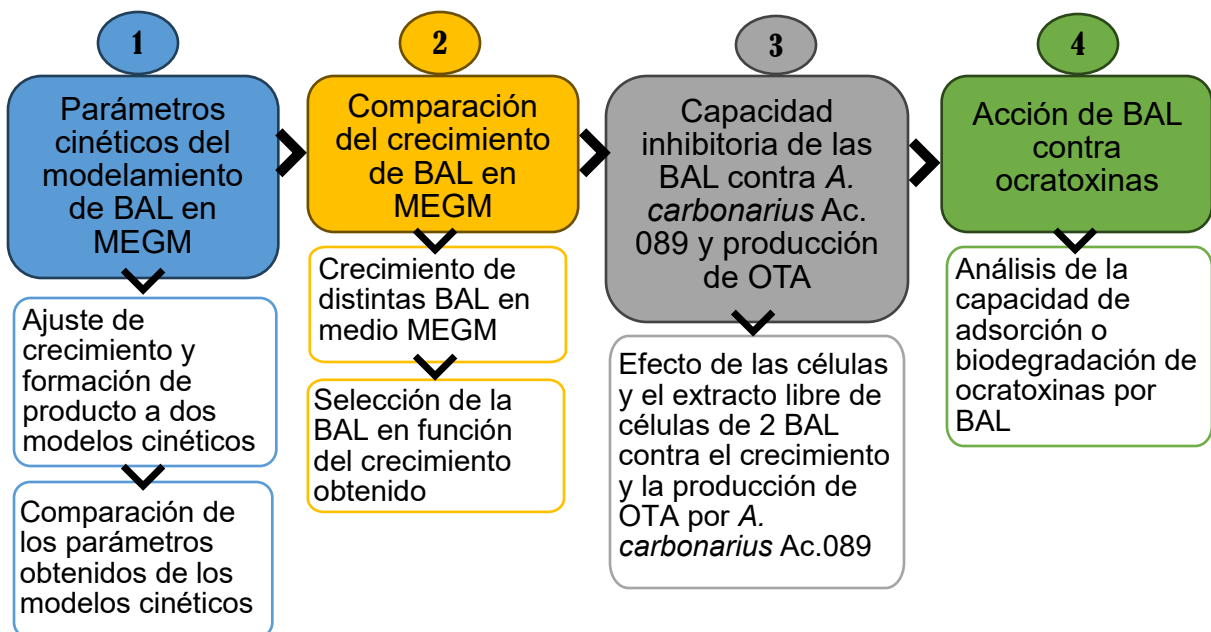
Determinar la capacidad de inhibición de bacterias ácido lácticas (BAL), cultivadas en un medio de cultivo formulado con extracto de germen de malta (MEGM), sobre el crecimiento de *A. carbonarius*, la producción de ocratoxina A (OTA) y su capacidad de biotransformar o secuestrar la OTA.

### 5.2 Objetivos Específicos

- Determinar el modelo cinético que mejor describa el comportamiento de *L. plantarum* B31 durante su crecimiento y formación de ácido láctico en un medio formulado con EGM.
- Evaluar el crecimiento de seis diferentes cepas BAL aisladas de pulpa de café en el medio MEGM.
- Encontrar la concentración mínima inhibitoria de dos BAL en MEGM sobre la germinación de *A. carbonarius* Ac 089 y la producción de OTA.
- Estimar el efecto del extracto libre de células de dos BAL en MEGM sobre la germinación de *A. carbonarius* Ac 089 y la producción de OTA.
- Determinar la capacidad de dos BAL cultivadas en MEGM para adsorber o biodegradar la aflatoxina B1 (AFB1), y la ocratoxina A (OTA).

## 6 ▶ Estrategia experimental

La estrategia experimental diseñada para alcanzar los objetivos se caracterizó por la implementación de cuatro fases experimentales ([Figura 6.1](#)). Durante la primera fase, ajustaron los datos experimentales crecimiento y formación de ácido láctico de *L. plantarum* B31 cultivada en un medio formulado con EGM a dos modelos cinéticos con el fin de determinar el modelo que mejor describiera dicho comportamiento. En la siguiente fase, se cultivaron seis BAL en el mismo medio de cultivo y se comparó el crecimiento con el obtenido en el medio MRS. En la tercera fase, se usaron dos BAL para estudiar su capacidad inhibitoria contra el crecimiento del hongo y controlar la producción de OTA de un hongo ocratoxigénico (*A. carbonarius* Ac. 08). La cuarta fase consistió en determinar el mecanismo por el cual las BAL actúan sobre las ocratoxinas.



**Figura 6.1** - Estrategia experimental diseñada en cuatro etapas con actividades generales y particulares.

## 7 ▶ Materiales y métodos

### 7.1 Microorganismos y condiciones de cultivo

#### 7.1.1 Bacterias ácido lácticas

Se utilizaron seis bacterias aisladas de pulpa de café, identificadas mediante caracterización genotípica y secuenciación parcial del fragmento 16S-rRNA (Djossou et al., 2011). Todas las cepas fueron registradas en el Banco de Genes. Tres cepas fueron proporcionadas por el Institut de Recherche pour le Développement, Francia (IRD): *Lactiplantibacillus plantarum* (anteriormente *Lactobacillus plantarum*) MZ809351.1 (B31), *L. plantarum* MZ809350.1 (B34) y *L. plantarum* MZ801739.1 (BJ) (Djossou et al., 2011). Las otras tres cepas, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa, México (UAM-I): *L. plantarum* MN982928.1 (B3), *L. plantarum* MN922335.2 (B7) y *Leuconostoc citreum* MZ801735.1 (B23). B3, B7, B23, B31, B34 y BJ son códigos internos utilizados en nuestro laboratorio para su rápida identificación. Todas las cepas bacterianas se conservaron en medio crioprotector con glicerol y caldo MRS (Difco™, Sparks, EE. UU.) (1:2, v/v) a -18 °C. Para todos los experimentos, las células se activaron y propagaron dos veces en caldo MRS estéril con un inóculo al 10 % (v/v), se incubaron a 30 °C durante 24 h.

### 7.1.2 *Aspergillus carbonarius* Ac 089

El hongo utilizado para los ensayos de inhibición de crecimiento y producción de OTA fue *Aspergillus carbonarius* Ac 089, proporcionado por el IRD. Este microorganismo, aislado de café contaminado de Costa de Marfil, se ha reportado que es capaz de producir hasta 27 000 µg de OTA/Kg de medio (Djossou et al., 2011). El hongo se mantuvo en medio crioprotector compuesto por glicerol y agar levadura Czapek (CYA) (1:2, v/v). Para la activación de *A. carbonarius* Ac 089, se agregaron 50 µL del conservado a 20 °C en 50 mL de medio agar papa dextrosa estéril (PDA, BD BIOXON®) para llevarlo a incubación a 30 °C durante siete días. Posteriormente, se hizo una resiembra en agar PDA estéril y se llevó a incubación a 30 °C durante siete días. Se preparó una suspensión de esporas de  $1 \times 10^5$  esporas/mL en una solución de Tween 80 al 0.1% (v/v) con ayuda de un hemocitómetro para cada experimento en donde se utilizó *A. carbonarius* Ac 089.

## 7.2 Medio de cultivo con extracto de germen de malta

### 7.2.1 Preparación del extracto de germen de malta para el medio de cultivo

El medio de cultivo empleado para todos los experimentos se formuló a partir de un extracto de germen de malta de cebada (EGM), empleado principalmente como fuente de proteínas, además de carbohidratos. El extracto se obtuvo a partir de los granos de cebada (*Hordeum vulgare*) adquiridos en un mercado mayorista en la Ciudad de México, de acuerdo con el procedimiento detallado a continuación:

- *Lavado y desinfección de los granos de cebada.* 1 Kg de granos de cebada se lavaron cinco veces con jabón neutro y agua potable. A continuación, los granos se rociaron con una solución acuosa de etanol al 70 % (v/v) y se mantuvieron así durante 30 s. Posteriormente, se enjuagaron con agua potable y se colocaron en una disolución acuosa de hipoclorito de sodio al 10 % (v/v) durante 5 min, para después enjuagarlos con agua potable 5 veces con un volumen equivalente al del peso de los granos de cebada iniciales. Finalmente, los granos de cebada se colocaron con agua en un recipiente semicerrado durante 12 h.
- *Germinación.* Después del tiempo de remojo, se les retiró el agua y se colocaron en porciones de 200 g en frascos de vidrio de 1 L. Los frascos se taparon con una gasa y se mantuvieron durante 5 días (hasta que las raíces del germen tuvieran 3 veces el tamaño del grano) a temperatura ambiente (20 – 25 °C). Los frascos se agitaron levemente cada 4 h para evitar la acumulación de calor.
- *Secado.* Al término del proceso de germinación (5 días) los granos germinados se distribuyeron en charolas de aluminio y se colocaron en una estufa a 60 °C durante 24 h para detener la germinación. Al final de este paso, los granos de cebada se denominan comúnmente “malta” (Kok et al., 2018).
- *Separación de raíces y germen.* Los granos de malta se tamizaron (malla 30) para separar los granos de las raíces y el germen. Las raíces y el germen

seco se conservaron en un recipiente cerrado a temperatura ambiente hasta su uso.

- *Extracción.* El germen de malta y las raíces se colocaron en un recipiente con agua destilada en una proporción de 100 g de raíces secas/L y se mantuvieron a 60 °C durante 4 h. Después de este tiempo, se separó el extracto del germen con ayuda de un colador y se centrifugó a 3000 rpm por 15 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró (Whatman no. 40) al vacío para obtener un líquido sin sólidos. El extracto final se denominó “Extracto de germen de malta (EGM)” y se conservó en un recipiente en congelación hasta su uso.
- *Preparación del medio de cultivo con extracto de germen de malta (MEGM).* Los componentes para preparar el medio de cultivo MEGM se muestran en la [Tabla 7.1](#). Para ello, todos los ingredientes del medio se disolvieron en 1 L del EGM y se esterilizaron a 121 °C y 15 psi por 15 min.

**Tabla 7.1** - Composición del medio de cultivo para disolver en 1 L de extracto de germen de malta MEGM.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	20
Extracto de levadura	5
Citrato de amonio	2
Fosfato de potasio	1.5
Sulfato de magnesio	0.4
Acetato de sodio	3.9
Sulfato de magnesio	0.06
Adicionar 1 mL de Tween 80	

### 7.2.2 Condiciones de cultivo de bacterias ácido lácticas en el medio con extracto de germen de malta

El crecimiento de diferentes BAL se evaluó en el medio de cultivo MEGM. Se utilizaron seis cepas de BAL denominadas *L. plantarum* B31, *L. plantarum* B34, *L. plantarum* BJ, *L. plantarum* B3, *L. plantarum* B7 y *Leuconostoc citreum* B23. Con un inóculo de 10 % (v/v) en el medio MEGM ([Tabla 7.1](#)) se incubaron a 30 °C durante 24 h. Una vez terminada la incubación, se tomó una muestra para cuantificar su crecimiento por gravimetría (Li & De Orduña, 2010) y por cuenta en placa. Los resultados se expresaron en gramos de biomasa por litro (g/L) y en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL), respectivamente. Las bacterias también fueron cultivadas en medio MRS a las mismas condiciones como control. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

### 7.3 Inhibición de crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y reducción de la producción de ocratoxina A

Se evaluó la capacidad de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 cultivadas en el medio de cultivo con extracto de germen de malta (MEGM), para inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 mediante la técnica de cultivos envenenados (Balouiri et al., 2016). Después de 24 h de cultivo, se prepararon diferentes concentraciones iniciales de BAL para probar el efecto del medio obtenido bajo estas condiciones (células y metabolitos) sobre el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y su producción de OTA. Por otra parte, se evaluó el efecto del extracto libre de células (ELC, metabolitos) sobre el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y su

producción de OTA. Se utilizó el agar MRS y el agar MEGM en todas las condiciones.

### 7.3.1 Técnica de cultivos envenenados con células viables

Los experimentos basados en cultivos envenenados se realizaron con diferentes concentraciones de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 ( $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^9$  UFC/mL) para determinar la menor concentración con la que se puede inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089, así como su producción de OTA. Las BAL se prepararon como se describe en la Sección 7.1.1. Tras la segunda resiembra, se cultivaron en MEGM durante 24 h a 30 °C. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas ( $10^1$  -  $10^{-8}$ ) en solución salina (NaCl 0.9 %, p/v). A continuación, empleando la técnica de vertido se colocaron 10 % (v/v) de cada dilución en cajas de Petri (90 x 15 mm) con 90 % (v/v) de agar MRS o agar MEGM (ingredientes de la [Tabla 7.1](#) adicionado con 1.5 % (p/v) de agar bacteriológico). Después de la gelificación, se realizó un orificio de 8 mm de diámetro en el centro de cada caja. Se preparó una suspensión de esporas de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de *A. carbonarius* Ac 089 como se indica en la Sección 7.1.2 y se inocularon 100  $\mu$ L de la suspensión en los orificios con cada una de las diluciones de BAL en ambos medios de cultivo. Los controles respectivos consistieron en el inóculo de *A. carbonarius* Ac 089 en agar MRS y MEGM sin la adición de BAL. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 144 h. Cada 24 h se midió y se registró el diámetro del crecimiento del hongo en cada tratamiento y en el control. Al tercer y sexto día se extrajo la OTA y se cuantificó por cromatografía



líquida de alto rendimiento (HPLC). La inhibición del crecimiento (%) del hongo se determinó de acuerdo con la Ecuación 7.1, mientras que la reducción de concentración de OTA (%) se determinó de acuerdo con la Ecuación 7.2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\text{Inhibición del crecimiento (\%)} = \frac{DC-DT}{DC} * 100 \quad \text{Ecuación 7.1}$$

Donde **DC** es el diámetro de crecimiento del hongo en las condiciones control y **DT** es el diámetro de crecimiento del hongo en los tratamientos.

$$\text{Reducción de la concentración de OTA (\%)} = \frac{OTAc-OTAt}{OTAc} * 100 \quad \text{Ecuación 7.2}$$

Donde **OTAc** es la concentración de OTA producida por el hongo en las condiciones control y **OTAt** es la concentración de OTA producida por el hongo en los tratamientos.

### 7.3.2 Técnica de cultivos envenenados con extracto libre de células

El efecto del ELC de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 se evaluó sobre el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089, así como sobre su producción de OTA. Las BAL se prepararon como se describe en la Sección 7.1.1. Tras la segunda resiembra, cada BAL se cultivó en MEGM durante 24 h a 30 °C. Al final de la incubación, los cultivos de cada BAL se centrifugaron (10000 rpm, 10 min) y el sobrenadante se filtró (0.22 µm) para obtener el ELC. A continuación, se colocó 10 % (v/v) por la técnica de vertido del ELC de cada BAL en las cajas de Petri (90 x 15 mm) donde se vertió 90 % (v/v) de agar MRS o agar MEGM. Después de la gelificación, se realizó un orificio de 8 mm de diámetro en el centro de cada caja donde se inocularon 100 µL de una suspensión de esporas con 1×10<sup>5</sup> esporas/mL de *A. carbonarius* Ac 089 preparada de acuerdo con la Sección 7.1.2. Los controles

para cada medio consistieron en el inóculo de *A. carbonarius* Ac 089 en agar MRS o en agar MEGM sin la adición del ELC de las BAL. Las cajas se incubaron a 30 °C durante 144 h. Se tomaron muestras como se indica en la Sección 7.3.1 y la inhibición del crecimiento del hongo (%) se estimó con la Ecuación 7.1, mientras que la reducción de la concentración de OTA (%) se estimó con la Ecuación 7.2. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 7.4 Adsorción y biodegradación de micotoxinas por bacterias ácido lácticas

### 7.4.1 Ensayos con bacterias ácido lácticas viables

Se usaron dos cepas de BAL (*L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31) para evaluar su capacidad de biodegradar o adsorber la aflatoxina B1 (AFB1) y la ocratoxina A (OTA). Los estándares de micotoxinas se adquirieron de Sigma-Aldrich ® en una concentración inicial de 1 mg/mL. La AFB1 se disolvió en acetonitrilo grado HPLC y la OTA en metanol grado HPLC. Se diluyeron adicionalmente hasta obtener una concentración de 10000 ng/mL con una solución compuesta por ácido acético/agua destilada 0.5/99.5 (v/v) para preparar soluciones estándar diluidas de diferentes concentraciones.

Las BAL se prepararon como se indica en la Sección 7.1.1. Después de la segunda resiembra, las BAL se inocularon en MEGM con 10 % (v/v) y se incubaron a 30 °C durante 24 h. A partir de esta fermentación, 5.7 mL de cada BAL se transfirieron a

nuevos tubos de ensaye estériles y se les añadió 0.3 mL de cada micotoxina diluida por separado para tener una concentración final de 50 ng/mL de cada micotoxina. Los tubos se incubaron a 30 °C en agitación durante 96 h. Se tomaron muestras tanto del pellet (células) como del sobrenadante (ELC) a las 0, 6, 24 y 96 h y se determinó la micotoxina ligada (%) de acuerdo con la Ecuación 7.3. Se prepararon controles positivos con el medio MEGM sin inocular. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

$$\text{Micotoxina ligada (\%)} = \frac{CMF}{CMI} * 100 \quad \text{Ecuación 7.3}$$

Donde CMI es la concentración de la micotoxina inicial (0 h) y CMF es la concentración de micotoxina final (6, 24 y 96 h).

#### 7.4.2 Ensayos con bacterias ácido lácticas no viables

Los ensayos de adsorción y biodegradación de micotoxinas por BAL descritos en la Sección 7.4.1 se aplicaron para evaluar el efecto de adsorción y biodegradación de OTA de las células no viables de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31. Después de la incubación de la BAL en MEGM a 30 °C durante 24 h, se centrifugó el cultivo (10000 rpm, 10 min) y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron dos veces con buffer de fosfatos (PBS, 0.01 M, pH 7.4) y se centrifugaron (10000 rpm, 10 min). A continuación, las células se colocaron en un baño María a 80 °C durante 30 min seguida de una sonicación durante 20 min. Finalmente, las células se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y se recuperó el botón de células para resuspenderlo en una solución de OTA en ácido acético/agua destilada 0.5/99.5 (v/v) a una concentración de 50 ng/mL; esta suspensión se llevó a incubación a 30

°C en agitación durante 96 h. Se tomaron muestras tanto del pellet (células) como del sobrenadante (ELC) a las 0, 6, 24 y 96 h y se determinó la micotoxina ligada (%) de acuerdo con la Ecuación 7.3. La ausencia de crecimiento bacteriano se verificó inoculando 20 µL de la suspensión bacteriana en agar MRS e incubándola durante 48 h a 30 °C. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## 7.5 Análisis de aflatoxina B1 y ocratoxina A

### 7.5.1 Extracción de aflatoxina B1 y ocratoxina A

#### Extracción de OTA del cultivo sólido

Para cada experimento, la OTA se extrajo a partir del medio de cada placa de agar (Sección 7.3). Se tomaron tres discos de 5 mm de diámetro, de la periferia de las colonias que se desarrollaron en cada tratamiento y se pesaron. A continuación, se les añadió 2.5 mL de solución de metanol:ácido fórmico (25:1 v/v) y se colocaron en un baño ultrasónico durante 20 min. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm, durante 15 min, y el sobrenadante se llevó a sequedad (70 °C, 4 h) en un baño seco. El residuo se resuspendió en 1 mL de fase móvil (metanol:agua:ácido acético; 69:30:1) y se realizaron las diluciones necesarias antes de filtrar las muestras a través un filtro de nylon de 0.22 µm (Suárez-Quiroz et al., 2005).

#### Extracción de OTA y AFB1 del cultivo líquido

Para los ensayos de adsorción y biodegradación (Sección 7.4) las muestras con AFB1 y OTA se centrifugaron a 10000 rpm por 10 min para separar el sobrenadante de las células. El sobrenadante de cada tratamiento se filtró por un filtro de nylon de

0.45  $\mu\text{m}$  y se realizó una dilución 1/10 (v/v) con la fase móvil (ácido acético/agua destilada 0.5:99.5 v/v). El botón de células se mezcló con 5 mL de metanol:agua (50:50; v/v) para la extracción de las micotoxinas adsorbidas (AFB1 y OTA). Las mezclas se colocaron en un baño ultrasónico durante 20 min y se filtraron por un filtro de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . La micotoxina extraída de esta manera se congeló (-18 °C) para su posterior análisis

### 7.5.2 Cuantificación de aflatoxina B1 y ocratoxina A

La cuantificación de la OTA se llevó a cabo en un HPLC; Shimadzu, UFCL-XR), con una columna de fase reversa C18 (Thermo Scientific, 250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ), a 30 °C, provisto con un detector de fluorescencia y una fase móvil de metanol:agua:ácido acético (69:30:1). El volumen de inyección fue de 50  $\mu\text{L}$  y el flujo de 1 mL/min. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 333 y 460 nm, respectivamente. Se construyó una curva de calibración en el rango de concentración de 0 a 100 ng/mL de OTA (Biopharm Rhone) (Anexo 2).

La concentración de la AFB1 se cuantificó mediante HPLC (Shimadzu, UFCL-XR) con un detector de fluorescencia por derivatización post columna (KOBRA® CELL, R-Biopharm, Darmstadt, Germany) y una columna fase reversa (C18, 2.1  $\mu\text{m}$  Thermo Scientific) a 50°C. El volumen de inyección fue de 50  $\mu\text{L}$  y el flujo fue de 0.8 mL/min. Se utilizó como fase móvil agua destilada 60 % (v/v), acetonitrilo 20 % (v/v),

metanol 20 % (v/v), 120 mg/L de KBr y 350  $\mu$ L de ácido nítrico 4 M para 1 L. Las longitudes de onda de excitación y emisión fueron 362 y 425 nm, respectivamente.

## 7.6 Consideraciones matemáticas para el análisis del crecimiento de *L. plantarum* B31 y la formación de ácido láctico

En un primer momento, se analizaron los datos experimentales de crecimiento de la biomasa y formación de ácido láctico de *L. plantarum* B31 obtenidos en cuatro formulaciones del medio MEGM realizadas en un trabajo previo: M1, M2, M3 y M4 (Domínguez-Gutiérrez et al., 2023a). Se empleó el modelo clásico de crecimiento exponencial, el cual se integró y el valor de  $\mu_{exp}$  se estimó como la pendiente del logaritmo natural del incremento de la biomasa función del tiempo en la fase exponencial (Ecuación 7.4). A continuación, con el fin de obtener la simulación confiable de crecimiento y formación de producto de *L. plantarum* B31 los datos de concentración de biomasa se ajustaron con al modelo logístico (Ecuación 7.5) y el modelo de Gompertz (Ecuación 7.6) en todas las condiciones ensayadas. Los parámetros involucrados en el crecimiento de la BAL ( $X_0$ ,  $X_{max}$ ,  $\mu$  y  $k$ ) se estimaron minimizando la suma de los cuadrados de los errores con la subrutina Solver empleada para estimación de parámetros en modelos no lineales contenida en Excel ® (Suarez-Ospina, 2018).

La ecuación diferencial del modelo logístico se acopló al modelo de Luedeking-Piret (Ecuación 7.7) descrito por Soto-Cruz et al. (2002) para simular la formación de AL (producto,  $P$ ). Por otro lado, la ecuación diferencial del modelo de Gompertz se

acopló al modelo de Luedeking-Piret (Anexo 1) para simular la formación de AL (producto,  $P$ ) (Domínguez-Gutiérrez et al., 2023b) (Ecuación 7.8). Así se desarrolla un modelo alternativo que describe el comportamiento cinético de *L. plantarum* B31 en un medio optimizado. Los parámetros de los modelos logístico y Gompertz acoplados a Luedeking-Piret ( $\alpha$  y  $\beta$ ) se estimaron usando la subrutina de regresión multilínea contenida en Excel®. En el caso del modelo de Gompertz acoplado a Luedeking-Piret se estimaron las funciones el logaritmo integral,  $li(X_0/X_{max})$  y  $li(X/X_{max})$  definidos como  $li(X) = \int_0^X \frac{du}{\ln(u)}$ ; esta función se evaluó numéricamente con el software de libre acceso Maxima (<https://maxima.sourceforge.io>). Por último, se estimó el parámetro  $v$  (Ecuación 7.9) el cual indica si la formación de producto (AL) está asociada o no asociada al crecimiento (Viniegra-González et al., 2003). Las ecuaciones empleadas son:

$$\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{exp} \quad \ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_{exp} t \quad \text{Ecuación 7.4}$$

$$X = \frac{X_{max}}{1 + \left[\left(\frac{X_{max} - X_0}{X_0}\right)^* e^{-\mu t}\right]} \quad \text{Ecuación 7.5}$$

$$\frac{dX}{dt} = kX \ln\left[\frac{X_{max}}{X}\right] \quad \text{Ecuación 7.6}$$

$$P(X) = P_0 + \alpha(X - X_0) + \frac{\beta X_{max}}{\mu} \ln\left[\frac{X_{max} - X_0}{X_{max} - X}\right] \quad \text{Ecuación 7.7}$$

$$P = P_0 + \alpha(X - X_0) + \left[\frac{\beta X_{max}}{k}\right] \left[li\left(\frac{X_0}{X_{max}}\right) - li\left(\frac{X}{X_{max}}\right)\right] \quad \text{Ecuación 7.8}$$

$$v = \frac{\beta}{\alpha(\mu \text{ o } k)} \quad \text{Ecuación 7.9}$$

donde  $\mu_{exp}$  es la tasa específica de crecimiento del modelo clásico exponencial,  $X$ ,  $X_0$  y  $X_{max}$  son las concentraciones de biomasa en función del tiempo, la concentración de biomasa inicial y la concentración máxima de biomasa (g/L), respectivamente;  $\mu$  y  $k$  son constantes específicas (1/h);  $t$  es el tiempo de cultivo (h);  $P$  y  $P_0$  son las concentraciones de AL en función de la biomasa formada y la cantidad inicial de AL

(g/L), respectivamente;  $\alpha$  (gP/gX) y  $\beta$  (gP/gXh) son las constantes de formación de AL asociada y no asociada con el crecimiento celular, respectivamente.  $li(X_0/X_{max})$  y  $li(X/X_{max})$  corresponden a las funciones del logaritmo integral evaluada con el software Máxima; y  $v$  es la relación entre la tasa de crecimiento específica y las constantes asociadas y no asociadas al crecimiento celular. Cabe mencionar que en  $v = \frac{\beta}{\mu \alpha}$  o  $v = \frac{\beta}{k \alpha}$  se puede usar la constante  $\mu$  y  $k$ , según corresponda al empleo de la ecuación logística o de Gompertz, respectivamente.



## 8 ▶ Resultados y discusión

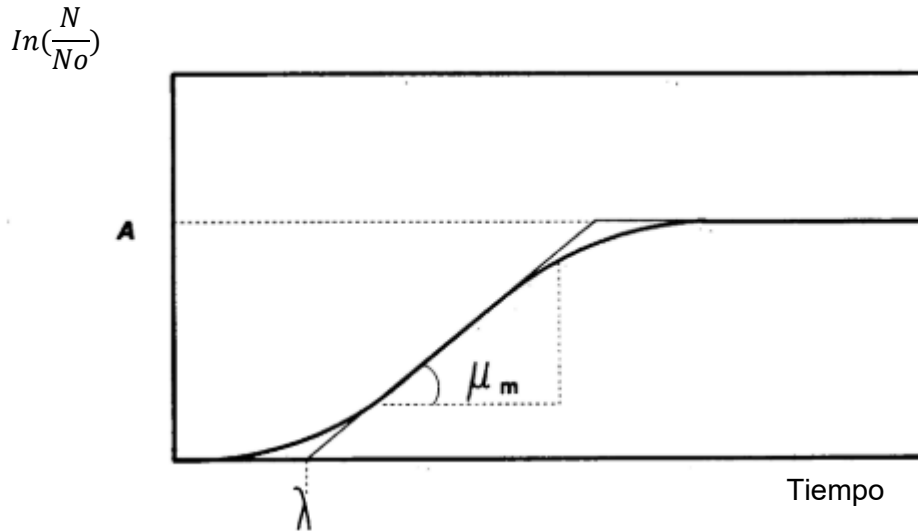
### 8.1 Análisis del crecimiento y formación de ácido láctico de *L. plantarum* B31

El objetivo del análisis que se presenta a continuación fue evaluar las similitudes y diferencias entre los modelos exponencial con el logístico y Gompertz y seleccionar el modelo que mejor describa el crecimiento de *L. plantarum* B31 cultivada en un medio formulado con extracto de germen de malta (MEGM). Los modelos logístico y Gompertz se acoplaron al modelo clásico de Luedeking–Piret para evaluar la formación de ácido láctico. Lo anterior, permite obtener parámetros técnicos relevantes que son criterios confiables para establecer estrategias de cultivos microbianos para la obtención de ácido láctico y biomasa como agente de control biológico de hongos micotoxigénicos.

#### 8.1.1 Análisis del crecimiento de *L. plantarum* B31

La curva de crecimiento bacteriano típica ([Figura 8.1](#)) presenta cuatro fases distintas: una fase inicial de retraso (fase lag) con crecimiento mínimo, en ocasiones no detectable, seguida por una fase exponencial con una rápida división celular, luego una fase de estabilización donde la concentración de biomasa se mantiene

constante, y, por último, una fase de muerte en la que las condiciones se vuelven adversas para el crecimiento celular (Taiwo et al., 2024).



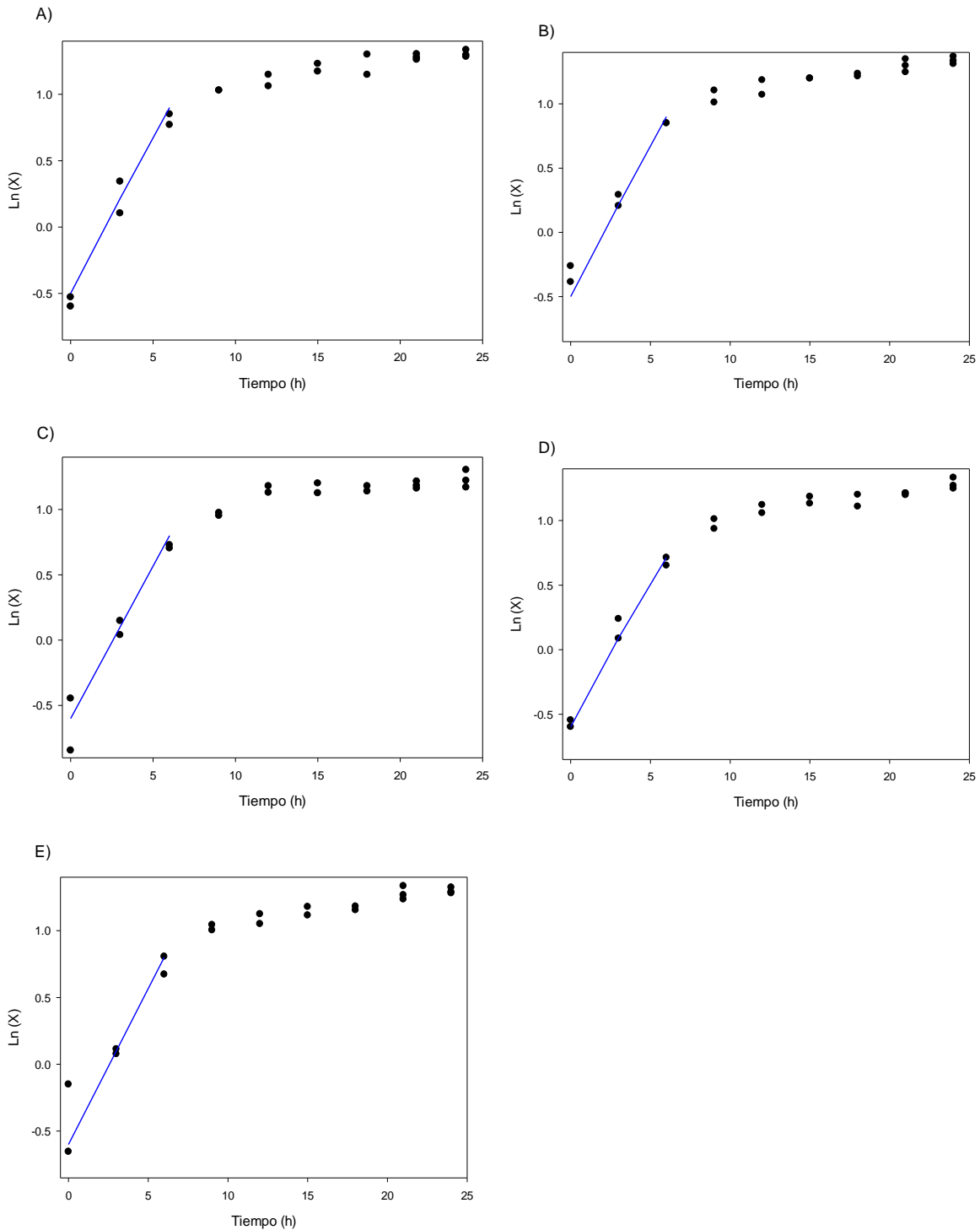
**Figura 8.1** – Curva de crecimiento bacteriano típica.  $\ln(N/N_0)$  es el logaritmo del número de organismos representados en función del tiempo. A es la asíntota que indica el momento donde la tasa de crecimiento disminuye.  $\mu_m$  representa la tasa de crecimiento específica y  $\lambda$  corresponde a la fase lag. Tomado de: *Appl. Environ. Microbiol.*, 56 (1990). DOI:0099-2240/90/061875-07\$02.00/0

El modelo clásico de crecimiento exponencial permite calcular  $\mu_{exp}$  como la pendiente durante el periodo en que  $\ln X$  en función del tiempo es lineal (Ecuación 7.4); esto permite hacer un primer análisis del crecimiento de la cepa crecida en los medios formulados con EGM y el medio MRS.

La fase de crecimiento exponencial de *L. plantarum* B31 se determinó analizando la derivada volumétrica  $\frac{dX}{dt}$  de la biomasa en función del tiempo (Figura 8.2), la cual comienza con un valor bajo y aumenta rápidamente hasta encontrar su valor

máximo. Así se determinó que la fase de crecimiento exponencial variaba de 0 a 6 h en todos los casos ensayados.

La [Figura 8.2](#) presenta las curvas de crecimiento de acuerdo con el modelo exponencial (Ecuación 7.4). En el periodo de 0 a las 6 h se estimó  $\mu_{exp}$  como pendiente del  $Ln X$  contra el tiempo. La fase de retardo (lag) no fue detectable, debido probablemente a la concentración de inóculo inicial establecida en 10 % (v/v). De esta forma se estimó  $\mu_{exp}$  para cada condición de los medios formulados con EGM ([Tabla 8.1](#)). Los valores de  $\mu_{exp}$  (1/h) que se estimaron fueron las siguientes:  $0.23 \pm 0.05$ ,  $0.20 \pm 0.02$ ,  $0.23 \pm 0.07$ ,  $0.21 \pm 0.04$  y  $0.21 \pm 0.04$ ; para los medios M1, M2, M3, M4 y MRS, respectivamente.

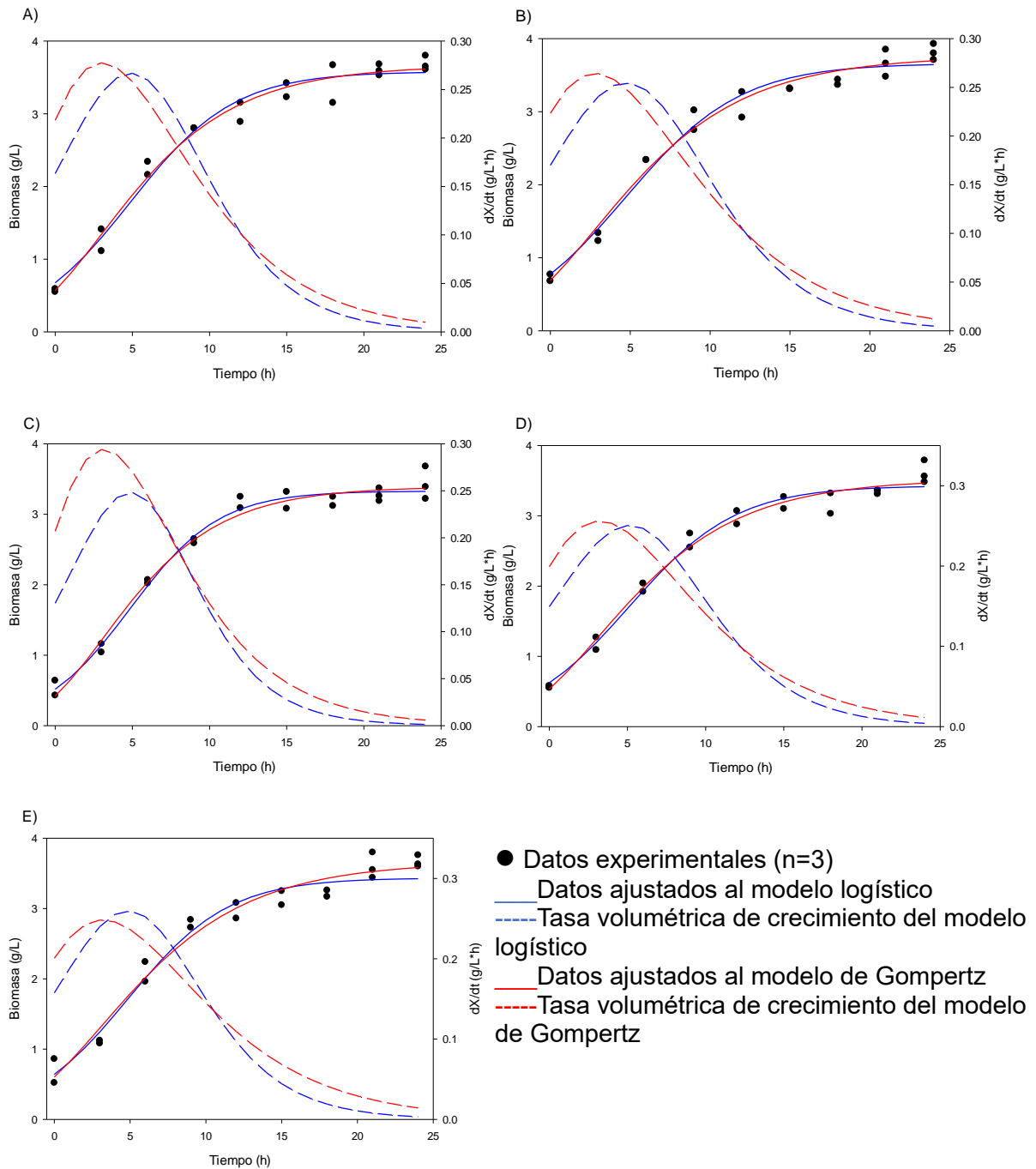


**Figura 8.2** - Cinéticas de crecimiento *L. plantarum* B31 ajustadas al modelo clásico y cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS (véase *Int. J. Food Microbiol*, 404 (2), 2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>. La línea azul representa la ecuación de la recta calculada de 0 a 6 h.

Es importante mencionar que el crecimiento exponencial indica el periodo de tiempo en que la biomasa crece en condiciones óptimas y consume de manera eficiente los nutrientes presentes en el medio formulado con EGM y lo convierte en biomasa (Arroyo et al., 2005). Cabe señalar que el valor de  $\mu_{exp}$  encontrado para el medio MRS, no presenta diferencia estadísticamente significativa con ninguno de los 4 medios ensayados. Esto es indicativo de que el medio formulado con EGM permite que los cultivos de BAL crezcan a la misma  $\mu_{exp}$  que el medio de referencia, pero con un costo menor (aproximadamente 30 %). Es importante insistir en que el modelo exponencial sólo es válido en un periodo de aproximadamente 6 h del cultivo microbiano (Zwietering et al., 1990).

Adicionalmente a este primer análisis, es importante contar con modelos que expliquen el comportamiento de las curvas de crecimiento microbiano de forma integral y con parámetros que tengan interpretación biológica (Zwietering, et al., 1990). En la literatura se encuentran varios modelos de crecimiento, como los modelos logístico, Richards y Gompertz los cuales se han aplicado a un amplio número de sistemas biológicos (Taiwo et al., 2024). En este trabajo se optó por usar el modelo logístico y de Gompertz para describir el crecimiento de *L. plantarum* B31. La [Figura 8.3](#) muestra la variación de la concentración de biomasa y su derivada volumétrica  $\frac{dX}{dt}$ , en función del tiempo para los cultivos realizados en los medios M1, M2, M3, M4 y MRS ajustados a los modelos logístico (Domínguez-Gutiérrez et al., 2023a) y Gompertz desarrollados en este trabajo (Anexo 1).

En todos los casos, se aprecia que para ambos modelos la calidad de ajuste fue razonablemente buena ([Tabla 8.1](#)), de acuerdo con el valor bajo de la suma de cuadrados (SC). En el caso del modelo de Gompertz (líneas punteadas rojas, [Figura 8.3](#)) el punto de inflexión aparece poco tiempo antes que en el caso del modelo logístico (líneas punteadas azules, [Figura 8.3](#)). El punto de inflexión indica un cambio en la tasa volumétrica de crecimiento ( $\frac{dX}{dt}$ ), que deja de aumentar, llega a su máximo valor y empieza a decrecer lentamente; la fase de crecimiento exponencial es relativamente corta (6 h); en este momento del cultivo termina la fase de crecimiento exponencial lo cual indica el momento en que la bacteria empieza a consumir los nutrientes de manera más lenta (Stavropoulou & Bezirtzoglou, 2019). El ajuste de los datos experimentales usando los modelos logístico y Gompertz respalda la idea de que el medio formulado con EGM permite alcanzar concentraciones similares de biomasa al final del cultivo que con el MRS ([Tabla 8.1](#)).



**Figura 8.3** - Cinéticas de crecimiento *L. plantarum* B31 ajustadas al modelo logístico (líneas azules) y Gompertz (líneas rojas) cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS (véase *Int. J. Food Microbiol*, 404 (2), 2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>.

### 8.1.2 Análisis de la formación de ácido láctico de *L. plantarum* B31

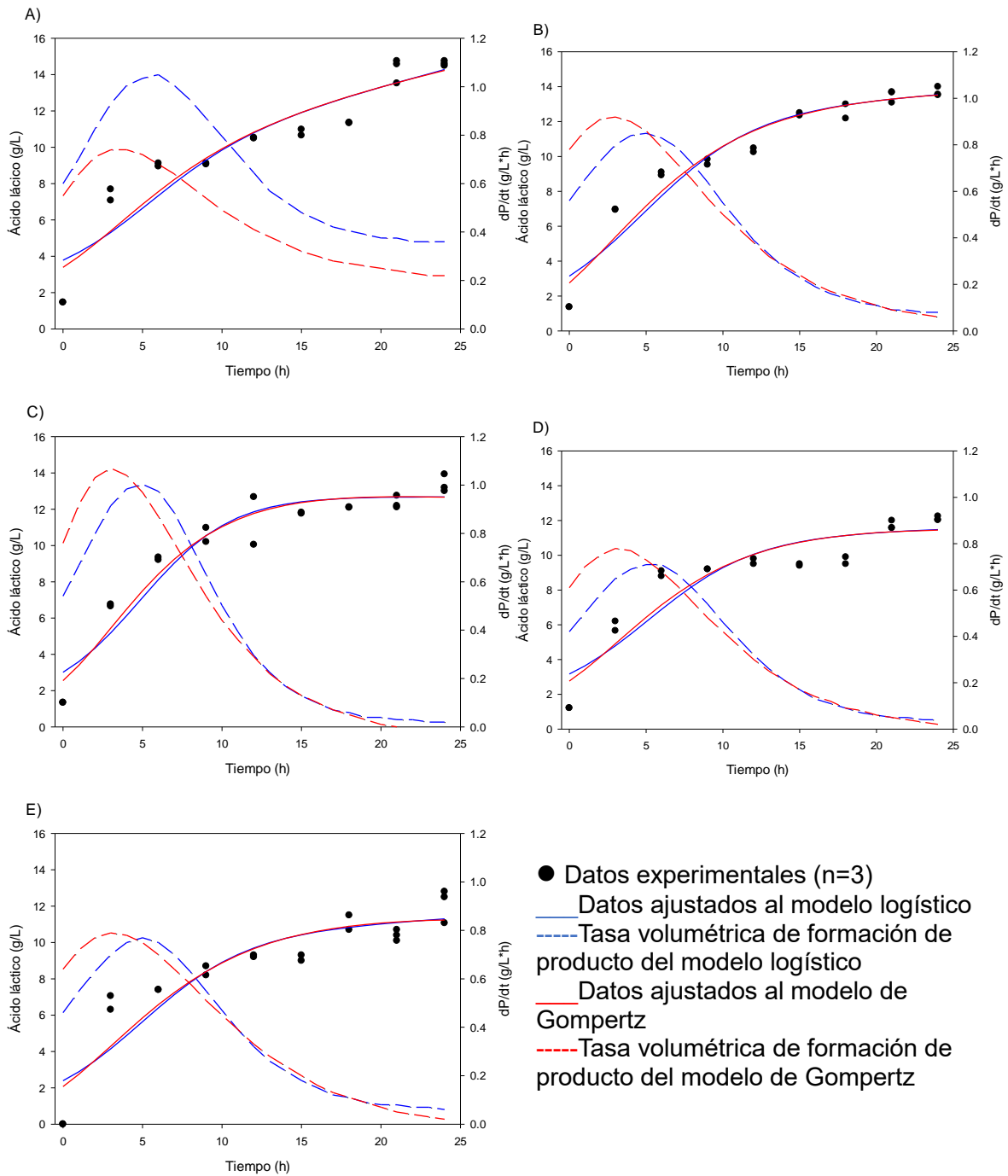
El modelo de Luedeking-Piret describe de manera adecuada el proceso fermentativo de un microorganismo, ya que considera la relación entre el crecimiento celular y la formación del producto (Deseure et al., 2021). Este modelo fue originalmente propuesto en 1959 por Robert Luedeking y Edgar L. Piret para el cultivo de la bacteria láctica *L. delbruekii* bajo condiciones de pH controlado (Luedeking & Piret, 1959). Este modelo considera que la formación de ácido láctico se divide en dos términos: uno asociado y otro no asociado al crecimiento celular. En el artículo original, Luedeking y Piret lo refieren como que la tasa instantánea de formación de ácido láctico está relacionada tanto con la tasa instantánea de crecimiento bacteriano como con la densidad bacteriana (Ecuación 7.7). Este modelo se ha aplicado a una amplia variedad de sistemas fermentativos para estudiar la formación de productos como ácido láctico (Popova-Krumova et al., 2024), glicerol (Wang et al., 2024), etanol (Salazar et al., 2023), entre otros (Di Biase et al., 2022; Popova-Krumova et al., 2024; Wang et al., 2024).

En este trabajo, la formación de ácido láctico por *L. plantarum* B31 se simuló usando: **a)** el modelo logístico acoplado a Luedeking-Piret (desarrollado por Soto-Cruz et al. 2002), para la bacteria ruminal *Megasphaera elsdenii* y aplicado al cultivo de BAL por Domínguez-Gutiérrez et al. (2023a); y **b)** el modelo de Gompertz acoplado al modelo de Luedeking-Piret producto de esta investigación (Anexo 1). En la [Figura 8.4](#) se muestran la variación de la concentración de ácido láctico y su



derivada volumétrica  $\frac{dP}{dt}$ , en función del tiempo durante el cultivo de *L. plantarum* B31 en los medios M1, M2, M3, M4 y MRS (Domínguez-Gutiérrez et al., 2023a) ajustados a dichos modelos.

En todos los casos, se aprecia que ambos modelos en su forma acoplada a Luedeking-Piret describen muy de cerca el comportamiento de los datos experimentales. La calidad de ajuste fue razonablemente buena de acuerdo con el valor bajo de la SC ([Tabla 8.1](#)). Así como en el caso anterior del análisis de las curvas de biomasa, el punto de inflexión aparece un poco antes en el caso del modelo de Gompertz (líneas punteadas rojas, [Figura 8.4](#)) que en el modelo logístico (líneas punteadas azules, [Figura 8.4](#)) lo cual indica que las fases de aceleración del crecimiento y producción de AL son rápidas mientras que las fases de desaceleración son lentas y ambas están acopladas.



**Figura 8.4** - Cinéticas de formación de ácido láctico de *L. plantarum* B31 ajustadas al modelo logístico (líneas azules) y Gompertz (líneas rojas) cultivada en A) Medio M1; B) Medio M2; C) Medio M3; D) Medio M4; E) Medio MRS ((véase *Int. J. Food Microbiol.*, 404 (2), 2023), <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>).

En este trabajo se hace una nueva propuesta consistente en acoplar el modelo de Gompertz al modelo de Luedeking-Piret, el modelo resultante predice correctamente la formación de ácido láctico y posibilita la definición de ecuaciones cinéticas exactas con las que se obtienen parámetros confiables que contribuyan a la toma de decisiones (Taiwo et al., 2024), como el establecimiento de factores como la composición del medio de cultivo usado (MEGM), que permitan el desarrollo de BAL y la producción de AL. Apoyados por ambos modelos cinéticos el uso del medio formulado con EGM permite a *L. plantarum* B31 un funcionamiento metabólico adecuado para su crecimiento y producción de AL.

### 8.1.3 Comparación entre los modelos Logístico y Gompertz acoplados al modelo de Luedeking-Piret

Se realizó una comparación de los parámetros obtenidos por los modelos logístico y Gompertz acoplados al modelo de Luedeking-Piret con el fin de seleccionar el modelo cinético que mejor describa el comportamiento de *L. plantarum* B31 y así proporcionar parámetros precisos de crecimiento y formación de producto que refuercen la toma de decisiones, mejoren las predicciones del comportamiento bacteriano y establezcan mejores bases para el diseño de biorreactores biológicos. La [Tabla 8.1](#) muestra los resultados de dichos parámetros.

**Tabla 8.1** - Parámetros del modelo Logístico acoplado a Luedeking-Piret y del modelo Gompertz acoplado a Luedeking-Piret de *L. plantarum* B31 cultivada en los medios M1, M2, M3, M4 y MRS (véase *Int. J. Food Microbiol*, 404 (2), 2023) <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>.

Medio		M1		M2		M3		M4		MRS	
Modelo		Gompertz	Logístico	Gompertz	Logístico	Gompertz	Logístico	Gompertz	Logístico	Gompertz	Logístico
Parámetros del modelo de crecimiento	$b$	1.86	Na.	1.7	Na.	2.09	Na.	1.89	Na.	1.80	Na.
	$X_o$ (g/L)	0.57	0.68	0.69	0.77	0.42	0.52	0.53	0.62	0.52	0.64
	$X_{max}$ (g/L)	3.67	3.58	3.76	3.66	3.39	3.33	3.52	3.43	3.66	3.44
	$k$ o $\mu$ (1/h)	<b>0.21</b>	0.3	<b>0.19</b>	0.28	<b>0.24</b>	0.35	<b>0.2</b>	0.29	<b>0.18</b>	0.30
	$\mu_{exp}$ (1/h)	<b>0.23 ± 0.05</b>		<b>0.20 ± 0.02</b>		<b>0.23 ± 0.07</b>		<b>0.21 ± 0.04</b>		<b>0.21 ± 0.04</b>	
	SC	0.39	0.51	0.45	0.55	0.37	0.31	0.33	0.39	0.57	0.52
Parámetros de la regresión multilínea	$\alpha$	2.39	2.16	3.46	3.23	3.68	3.48	3.05	2.8	3.23	2.85
	$\beta$	0.05	0.06	0.01	0.02	-0.01	0	0	0.01	-0.01	0.02
	$\nu$	0.11	0.1	0.01	0.02	-0.01	0	-0.01	0.01	0.02	0.03
	$P_{max}$ (g/L)	14.23	14.28	13.52	13.54	12.67	12.68	11.45	11.48	11.24	11.30
	$r^2$	0.9	0.88	0.95	0.93	0.94	0.92	0.88	0.85	0.86	0.84

Na.: No aplica

Los parámetros del crecimiento típico microbiano son la concentración inicial de biomasa ( $X_0$ ) y la concentración máxima de biomasa ( $X_{max}$ ). En todos los casos el modelo logístico sobreestima un poco los valores de la concentración de la biomasa inicial en comparación con el modelo de Gompertz; por otra parte, la concentración de la biomasa final es similar en todos los casos en ambos modelos y es muy cercana a los valores experimentales.

Otro parámetro valioso implicado en el crecimiento microbiano es la tasa específica crecimiento ( $\mu$  para el modelo logístico y  $k$  para el modelo de Gompertz), periodo en el cual los organismos crecen exponencialmente (Zwietering et al., 1990). De acuerdo con lo calculado en el modelo de crecimiento exponencial ( $\mu_{exp}$ ) el modelo logístico sobreestima estos valores de estos parámetros de carácter específico, en cambio en el caso del modelo de Gompertz las estimaciones de  $k$  en comparación con los valores de  $\mu_{exp}$  no presentan diferencias estadísticamente significativas, describe de manera precisa el comportamiento cinético de *L. plantarum* B31, especialmente en la fase de crecimiento exponencial. En este sentido, el modelo cinético de Gompertz puede ser una mejor opción para describir el crecimiento bacteriano y así establecer parámetros importantes en el crecimiento de microorganismos con diferentes aplicaciones, como el control biológico de microorganismos patógenos en alimentos (Shehata et al., 2019).

El intercambio de genes con resistencia a antibióticos y el cambio climático han propiciado el surgimiento de cepas patógenas en alimentos, lo que ha impulsado a

la búsqueda de microorganismos que posean la capacidad de controlar la contaminación fúngica o bacteriana en sistemas alimentarios (Romanens et al., 2019; Smith & Casadevall, 2023).

Por otro lado, la necesidad de adoptar tecnologías amigables con el medio ambiente ha motivado el uso de microorganismos como las BAL para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos (Sadiq et al., 2019), lo que conduce a implementar estrategias para modificar las condiciones de cultivo que mejoren el crecimiento microbiano. Entre estas estrategias se encuentran la modificación de la composición del medio de cultivo (Coghetto et al., 2016; Manzoor et al., 2017; Matevosyan et al., 2019), de parámetros como el pH y la temperatura (Di Biase et al., 2022; Juárez-Tomás et al., 2003) o el uso de consorcios microbianos (Gupta et al., 2024; Ponomarova et al., 2017). El uso de modelos cinéticos, como el de Gompertz, es un recurso eficaz para estudiar nuevas cepas con esas capacidades.

Por otro lado, los principales parámetros involucrados en la formación de producto son la concentración final de AL formada y las constantes de formación de AL asociada y no asociada con el crecimiento celular ( $\alpha$  y  $\beta$ , respectivamente). De tal forma, el parámetro  $v$  ( $v = \frac{\beta}{\mu \alpha}$  o  $v = \frac{\beta}{k \alpha}$ ) relaciona las tasas específicas de crecimiento ( $\mu$  o  $k$ ) con las constantes asociadas y no asociadas al crecimiento celular (Luedeking & Piret, 1959).

Ambos modelos estiman de manera semejante todos los parámetros antes mencionados. El valor de  $v$  indica, de acuerdo con Viniegra-González et al. (2003), que: cuando es cercano a 0, la formación de AL está asociada principalmente al crecimiento de la biomasa; cuando es mayor a 0, la formación de AL no está asociada al crecimiento; y cuando  $v$  es menor a 0 denota descomposición del producto durante el período de fermentación. De tal forma, los resultados obtenidos mostraron que, en todos los casos y con ambos modelos el valor calculado para  $v$  es cercano a 0, por lo que la formación de AL depende principalmente del crecimiento bacteriano. Como se mencionó anteriormente, el modelo de Gompertz es más confiable para representar los parámetros implicados en el crecimiento bacteriano que el modelo logístico, especialmente en la fase de crecimiento exponencial. Por lo tanto, es más preciso para determinar los parámetros involucrados en la formación de producto pues la producción de AL está asociada al crecimiento bacteriano.

Otro de los objetivos del modelado cinético es diseñar procesos de fermentación a gran escala (Sharma & Mishra, 2014). El ácido láctico es un producto con una amplia aplicación en la industria farmacéutica, alimentaria, cosmética, entre otras (Wang et al., 2021). Numerosos trabajos se han enfocado en el estudio de los parámetros que determinan la formación de AL o en maximizar su producción (Cheng et al., 2019; Ghimire et al., 2020; Sharma & Mishra, 2014; Wang et al., 2020). Estos análisis se pueden apoyar en el uso de modelos cinéticos, como el de Gompertz, para elegir las condiciones que conduzcan al diseño de procesos de

fermentación de AL a gran escala (Fan et al., 2016, Fan et al., 2017; Xu & Peng Xu, 2020).

Si bien el modelo logístico es una herramienta útil para la obtención de parámetros que ayuden a la toma de decisiones, no evalúa adecuadamente todas las fases de crecimiento microbiano puesto que es simétrico en el punto de inflexión (Stavropoulou & Bezirtzoglou, 2019). En definitiva, el modelo de Gompertz es una herramienta más adecuada para evaluar cuantitativamente el comportamiento bacteriano y recomendar la toma de decisiones importantes como el tiempo de cultivo más conveniente para la producción, uso y aplicación de BAL como agentes de control biológico de hongos micotoxigénicos.

## 8.2 Evaluación del crecimiento de bacterias ácido lácticas en medio con extracto de germen de malta

Las BAL *L. plantarum* B3, *L. plantarum* B7, *Leuconostoc citreum* B23, *L. plantarum* B31 *L. plantarum*, B34 y *L. plantarum* BJ se cultivaron tanto en caldo MEGM como en caldo MRS (control). En la [Tabla 8.2](#) se muestran las concentraciones de biomasa de las BAL y las cuentas en placa alcanzadas al final de 24 h de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que todas las BAL presentaron la capacidad de crecer en el caldo MEGM, sin diferencias significativas entre ambos medios de cultivo (MRS y MEGM). La mayor concentración de biomasa se obtuvo con *L. plantarum* B7 tanto en el caldo MEGM ( $4.26 \pm 0.24$  g/L) como en el caldo MRS (4.07



$\pm 0.20$  g/L). También se verificó la viabilidad celular de los cultivos mediante conteos en placa a las 24 h de cultivo. De la misma manera que en la cuantificación de la biomasa, el crecimiento en placa de todas las BAL no presentó diferencias significativas entre el caldo MEGM y en el MRS. Mediante este análisis se corroboró que *L. plantarum* B7 mantuvo el mayor crecimiento y viabilidad con valores de  $(7.6 \pm 4.2) \times 10^9$  y  $(7.2 \pm 4.1) \times 10^9$  UFC/mL en MEGM y MRS, respectivamente.

**Tabla 8.2** – Comparación del crecimiento de BAL en caldo MEGM y MRS.

BAL	Biomasa (g/L)		Cuenta total (UFC/mL)	
	MEGM	MRS	MEGM	MRS
<i>L. plantarum</i> B3	$3.6 \pm 0.7$	$3.7 \pm 0.6$	$(3.5 \pm 1.13) \times 10^9$	$(3.1 \pm 1.1) \times 10^9$
<i>L. plantarum</i> B7	$4.3 \pm 0.2$	$4.1 \pm 0.2$	$(7.6 \pm 4.2) \times 10^9$	$(7.2 \pm 4.1) \times 10^9$
<i>Leuconostoc</i> <i>citreum</i> B23	$1.2 \pm 0.2$	$1.0 \pm 0.3$	$(1.5 \pm 1.13) \times 10^8$	$(1.7 \pm 1.2) \times 10^8$
<i>L. plantarum</i> B31	$3.2 \pm 0.4$	$3.7 \pm 0.4$	$(3.3 \pm 4.24) \times 10^9$	$(3.6 \pm 3.1) \times 10^9$
<i>L. plantarum</i> B34	$2.7 \pm 0.9$	$2.2 \pm 0.9$	$(1.5 \pm 7.31) \times 10^9$	$(1.0 \pm 7.0) \times 10^9$
<i>L. plantarum</i> BJ	$2.9 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.3$	$(1.2 \pm 2.4) \times 10^9$	$(1.7 \pm 2.0) \times 10^9$

Es fundamental tener en cuenta ciertos elementos para cultivar BAL, debido a que tienen requerimientos nutricionales exigentes. Dado que las BAL requieren de carbohidratos para el crecimiento y la formación de metabolitos es necesario suministrarles en cantidad suficiente este componente (Gänzle, 2015). El medio

MEGM es elaborado a partir del germen de malta de cebada, el cual es un grano con un alto contenido de carbohidratos como la amilosa, la amilopectina y los  $\beta$ -glucanos (García-Lara, 2010; Pomeranz & Shands, 1974).

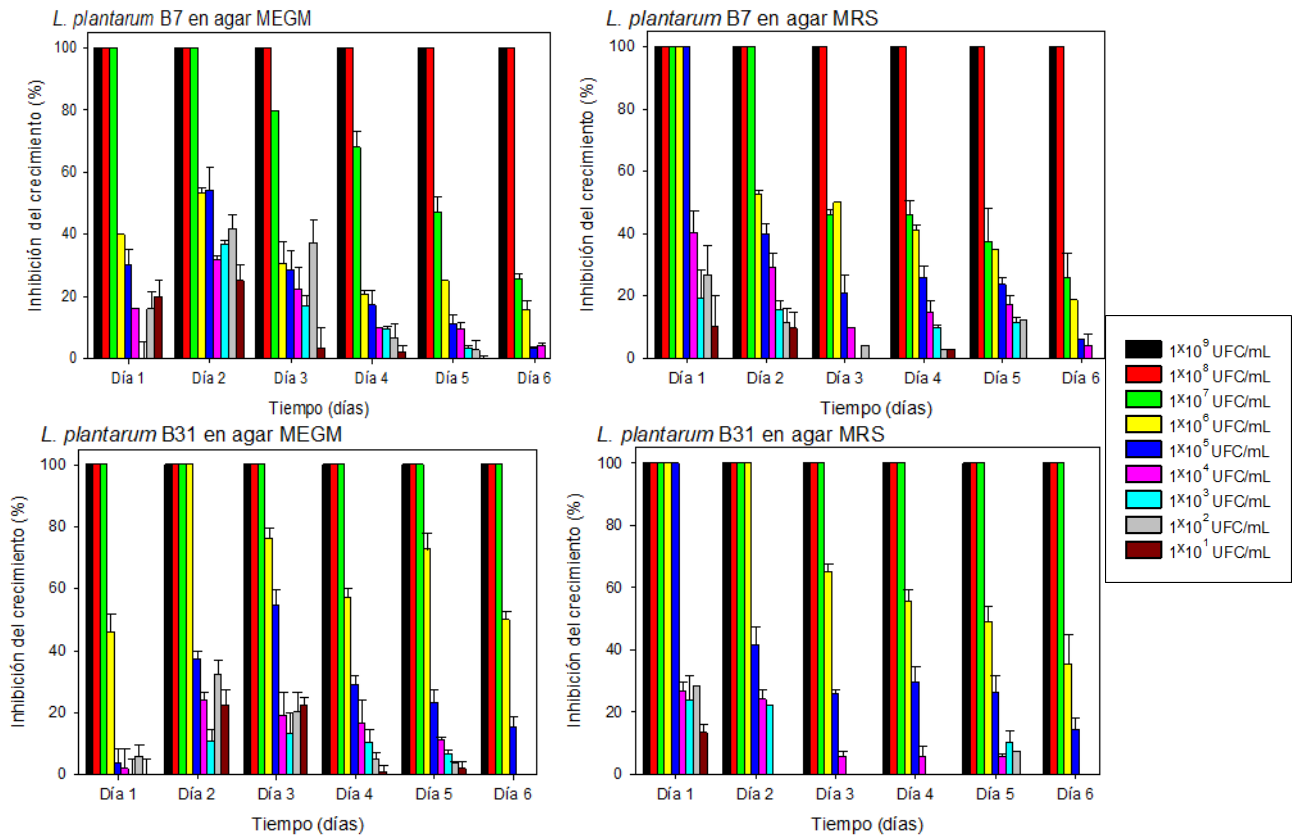
Además de los carbohidratos, el nitrógeno es otro de los elementos importante para las BAL, pues lo requieren principalmente para la síntesis de proteínas celulares y producción de ácidos nucleicos (Sabunevica & Zagorska, 2023). También está reportado que requieren el suministro de aminoácidos como cisteína, valina, leucina, ácido glutámico y arginina, debido a que no los pueden sintetizar como consecuencia de la pérdida de genes biosintéticos (Teusink & Molenaar, 2017). Aproximadamente el 50 % de las proteínas en raíces y brotes de la cebada son solubles en agua, de tal forma que el EGM es rico en aminoácidos y péptidos (Pomeranz & Shands, 1974)

Cabe destacar que cuando se compara el crecimiento de las seis BAL evaluadas en el medio MEGM y MRS, no se distinguen diferencias significativas. Teniendo en cuenta que el medio MRS es un medio balanceado formulado para el género *Lactobacillus* (De Man et al., 1960), microorganismos nutricionalmente exigentes, el medio MEGM posee capacidades similares al medio MRS al proveer los nutrientes necesarios para el crecimiento de BAL.

## 8.3 Inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y de la producción de ocratoxina A

### 8.3.1 Inhibición del crecimiento en presencia de bacterias ácido lácticas

Para determinar el efecto inhibitorio del crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 se seleccionaron dos BAL en función de su crecimiento en el medio MEGM y su origen: *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31. La primera se seleccionó porque presentó el mayor crecimiento ([Tabla 8.2](#)) y la segunda, porque previamente se ha reportado su capacidad para inhibir el crecimiento de hongos productores de OTA (Djossou et al., 2011). El experimento se llevó a cabo con diferentes concentraciones de cada BAL ( $1 \times 10^1$  -  $1 \times 10^9$  - UFC/mL) con el fin de determinar la menor concentración con la que se inhiba el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089. El crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 se monitoreó diariamente durante seis días. En la [Figura 8.5](#) se presentan los resultados expresados como porcentaje de inhibición (%), durante los seis días para las dos BAL en cada medio de cultivo (MRS y MEGM).



**Figura 8.5** - Inhibición del crecimiento (%) de *A. carbonarius* Ac 089 en agar MEGM y MRS durante seis días de cultivo con diferentes concentraciones de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31.

Las concentraciones de BAL con las que se obtuvo un 100 % de inhibición del crecimiento del hongo durante los seis días de cultivo fueron  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC/mL con *L. plantarum* B7 en ambos medios de cultivo (MRS y MEGM). Mientras que en el caso de *L. plantarum* B31 el máximo de inhibición se alcanzó desde  $1 \times 10^7$  UFC/mL. El porcentaje de inhibición de ambas BAL sobre el hongo fue disminuyendo a partir del día dos con la concentración  $1 \times 10^7$  UFC/mL y  $1 \times 10^6$  UFC/mL, para *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 respectivamente. Además, mientras más disminuyó la concentración de células iniciales de cada BAL, así

también disminuyó la inhibición del crecimiento del hongo, ya que el porcentaje de inhibición de crecimiento del hongo se redujo a menos de 50 % desde el segundo día de cultivo con las concentraciones iniciales de células de  $1 \times 10^6$  UFC/mL, en el caso de *L. plantarum* B7 y  $1 \times 10^5$  UFC/mL en el caso de *L. plantarum* B31. Cabe destacar que *L. plantarum* B31 inhibió con mayor eficacia el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 con la concentración de  $1 \times 10^7$  UFC/mL que *L. plantarum* B7 en ambos agares, sobre todo en el agar MEGM pues la inhibición del crecimiento se mantuvo entre 50 %, mientras que *L. plantarum* B7 a esa concentración logró inhibir entre 20 y 30 % el crecimiento del hongo en ambos medios de cultivo.

*L. plantarum* B31 es una BAL aislada de pulpa de café fresca en Costa de Marfil en donde se ha reportado la presencia de hongos ocratoxigénicos, principalmente especies de *Aspergillus* (Djossou et al., 2011). Es muy probable que esta bacteria, al crecer en presencia de estos hongos productores de OTA, desarrolló la capacidad de competir por espacio y por nutrientes de tal forma que conserva esta habilidad y es más efectiva que *L. plantarum* B7, quien no fue aislada de las mismas condiciones. Sin embargo, sería necesario realizar un perfil metabolómico de ambas BAL para evaluar las diferencias y confirmar esta teoría.

La tendencia observada puede indicar que el efecto inhibitorio de las BAL sobre el hongo podría deberse a una sinergia de mecanismos de acción, donde podemos identificar tres: efecto directo por contacto de las células de las BAL, producción de

metabolitos antifúngicos, y competencia por nutrientes y espacio (Schnürer & Magnusson, 2005).

Esta inhibición está en gran parte fomentada por la presencia de un mayor número de BAL presentes, ya que se ha demostrado que son capaces de adherirse a las esporas del hongo y de esta forma también pueden inhibir su crecimiento (Amador Hernández, 2019). Conforme se tiene un mayor número de BAL, la probabilidad de que un mayor número de bacterias puedan unirse a las esporas e inhiban su germinación aumenta. La relación calculada de la máxima concentración de BAL ( $1 \times 10^9$  UFC/mL) por espora ( $1 \times 10^5$  esporas/mL) fue de  $2 \times 10^5$  BAL/espora. Es decir que se requieren 200,000 células de BAL por espora fúngica para inhibir por completo el crecimiento del hongo. Por otra parte, cuando hay entre  $1 \times 10^1$  y  $1 \times 10^7$  UFC/mL la inhibición del crecimiento del hongo decae hasta la mitad ([Figura 8.5](#)).

El mecanismo al que se hace referencia en estos casos es el papel de la pared celular de las BAL, la cual está conformada por una matriz de peptidoglicano, así como ácido teicoico, ácido lipoteicoico, capas de proteínas y polisacáridos ácidos o neutros que participan en el mantenimiento de la forma celular bacteriana, en la interacción del huésped con el medio externo y en el intercambio de nutrientes y metabolitos (Palomino et al., 2023). La red de fibras del ácido teicoico y de los polisacáridos tienen la capacidad de adhesión y unión a macromoléculas, como las paredes celulares de los hongos, de manera que las células de BAL logran acoplarse a las paredes celulares de los hongos y degradar o desestabilizar los

polisacáridos ahí contenidos provocando la destrucción de las células fúngicas (Zolfaghari, et al., 2023).

Por otra parte, se ha estudiado también el mecanismo de acción de los metabolitos producidos por las BAL para entender cómo infringen daño en los hongos. Algunos de los metabolitos antifúngicos más estudiados son los ácidos orgánicos de cadenas cortas, como el ácido láctico, ácido propiónico, ácido acético, ácido succínico, que, además, son producidos en niveles del orden de g/Kg o g/L (Leyva Salas et al., 2017). Sin embargo, también se producen otras moléculas en niveles, del orden de mg/Kg o mg/L, que presentan actividad antifúngica como ácido hidroxicinámico, ácido D,L-β-fenilacético, ácido vanílico, ácidos grasos de cadenas largas como ácido decanoico, ácido 3-hidroxicanoico, ácido (S)-2-hidroxiisocáprico, ácido coriólico y ácido ricinoleico. Por otra parte, también se ha encontrado actividad en moléculas de origen proteico como los ciclopeptidos entre los que se encuentran ciclo(L- Pro-L-Pro), ciclo(L-Leu-L-Pro), ciclo(L-Tyr-L-Pro), ciclo(L-Met-L-Pro), ciclo(Phe-Pro), ciclo(Phe -OH-Pro), ciclo(L-Phe-L-Pro), ciclo(L-Phe-*trans*-4-OH-L-Pro), ciclo(L-His-L-Pro) y ciclo(L-Leu- Leu). Además, las BAL son capaces de producir reuterina y peróxido de hidrógeno, que tienen un poder antimicrobiano demostrado (Dalié et al., 2010; Leyva Salas et al., 2017; Schnürer & Magnusson, 2005; Siedler et al., 2019).

Dada la alta concentración en la que se encuentran en las fermentaciones de BAL, los ácidos orgánicos son de los compuestos que pueden participar en la inhibición

de los hongos. Los ácidos orgánicos pueden difundirse a través de la membrana plasmática de los hongos, provocando una disminución del pH intracelular con lo que aumenta la permeabilidad de la membrana. A su vez, pueden conducir a una acumulación de iones tóxicos con lo que se inhiben las reacciones metabólicas esenciales, desencadenando la muerte celular (Dalié et al., 2010; Leyva Salas et al., 2017; Schnürer & Magnusson, 2005).

Muhialdin et al. (2020) utilizaron una cepa de *Lactobacillus plantarum* aislada de soja fermentada (tempeh), demostrando una actividad antifúngica contra una cepa de *Aspergillus flavus*, en ensayos de agar MRS cubiertas con agar extracto de malta conteniendo las esporas de *A. flavus* después de 3 días de incubación a 30 °C. Los autores separaron los péptidos mediante cromatografía de exclusión por tamaño y utilizaron las fracciones recolectadas para determinar su actividad antifúngica frente a *A. flavus* mediante un ensayo en placa de microtitulación de 96 pocillos. Encontraron que los péptidos con peso menor a 10 kDa generados por la actividad enzimática de *L. plantarum* fueron los responsables de la inhibición. Los compuestos proteínicos fungicidas generalmente tienen un extremo hidrofóbico, otro hidrofílico, además de poseer propiedades catiónicas, de manera que actúan directamente con las moléculas de la superficie del hongo, asimismo, disipan el gradiente de protones a través de la membrana celular del hongo provocando su permeabilización y la consecuente fuga del contenido intracelular (Siedler et al., 2019).



En otro estudio, Shehata et al. (2019) identificaron 7 compuestos bioactivos del metabolismo de *Lactobacillus* spp. responsables de la inhibición de distintas cepas de *Aspergillus*, entre ellos el éster metílico del ácido 6-octadecenoico, el éster metílico del ácido hexadecanoico, fenol, 2,4-bis(1,1-dimetiletilo), (Z)-7-hexadecenal, pentadecano, dotriacontano y 2-metildecano (Mani-López et al., 2022).

Otras moléculas como el peróxido de hidrógeno poseen un efecto oxidante por lo que se les atribuye la destrucción de la membrana lipídica y las estructuras moleculares básicas de las proteínas celulares de los hongos (Schnürer & Magnusson, 2005).

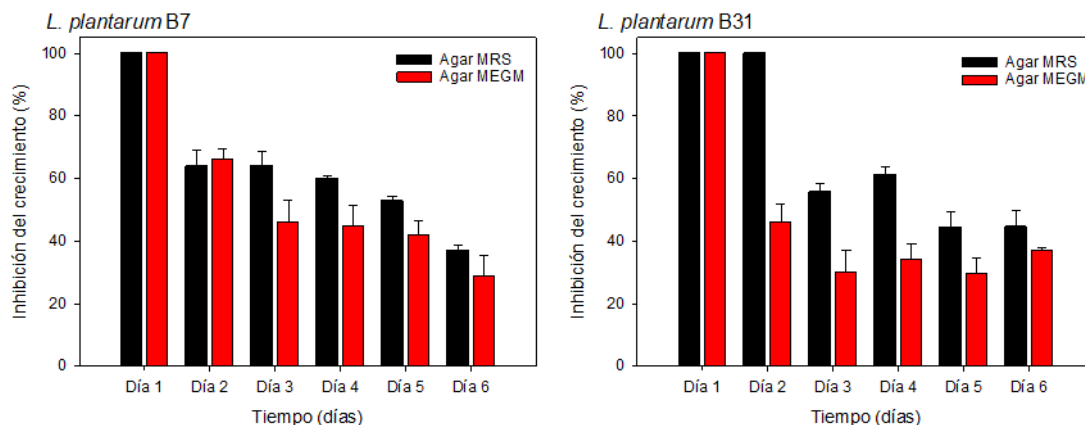
Si bien el mecanismo de acción más estudiado en la inhibición del crecimiento de hongos por BAL es la producción de metabolitos antifúngicos, las BAL los producen en concentraciones bajas, por lo que el efecto inhibitorio que poseen no sólo depende de los metabolitos producidos, sino que también se le puede atribuir a otro mecanismo como la competencia por nutrientes y por espacio (Siedler et al., 2019). Las bacterias crecen más rápido que los hongos y alcanzan su fase exponencial en las primeras horas de cultivo, como se observa en la [Figura 8.3](#) (Messens et al., 2003; Zwietering et al., 1990), de tal forma que hay más células que consumen los nutrientes disponibles limitando e incluso agotando el conjunto de nutrientes esenciales en el medio de crecimiento (Siedler et al., 2019) de manera que cuando el hongo está por comenzar su fase exponencial de crecimiento ya no cuenta con

suficientes nutrientes para crecer; sin embargo, este mecanismo ha sido muy poco estudiado.

Sin lugar a duda, el efecto inhibitorio observado en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores se puede explicar con base en una combinación de los múltiples mecanismos expuestos. Para esclarecer la importancia de la participación de los metabolitos producidos por las BAL en la inhibición del crecimiento del hongo, se realizó el siguiente ensayo.

### 8.3.2 Inhibición del crecimiento con el extracto libre de células

Se evaluó el efecto del ELC de cada BAL obtenido a las 24 h de cultivo con el fin de determinar si el mecanismo de inhibición del crecimiento fúngico se debió a la presencia de los metabolitos producidos por las BAL bajo las condiciones experimentales. En la [Figura 8.6](#) se muestran los resultados obtenidos de este ensayo.



**Figura 8.6** - Inhibición del crecimiento (%) de *A. carbonarius* Ac 089 en agar MRS y en agar MEGM durante seis días de cultivo con el extracto libre de células de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31.

Con el ELC de *L. plantarum* B31 el efecto inhibitorio se mantuvo en 100 % hasta el segundo día en agar MRS, disminuyó al 60 % a partir del tercer día y la inhibición del crecimiento se mantuvo en 40 % hasta el sexto día de cultivo. En cambio, en agar MEGM el efecto inhibitorio disminuyó al 30 % a partir del tercer día de cultivo manteniéndose así hasta el sexto día de cultivo. Con el ELC de *L. plantarum* B7 se observó una tendencia similar que con *L. plantarum* B31, pues el efecto inhibitorio fue ligeramente mejor en el medio MRS que en el MEGM en los primeros cuatro días de cultivo, pero al día quinto y sexto el porcentaje de inhibición de crecimiento fue de 40 y 30 %, respectivamente, sin observarse diferencias estadísticamente significativas. Resulta conveniente mencionar que, a pesar de no haber logrado un 100 % de inhibición del crecimiento del hongo con el ELC de ambas BAL, existe cierta actividad inhibitoria por parte de éstas, ya que aún al sexto día de cultivo se mantuvo un 30 % de inhibición del crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089, efecto que

se puede atribuir a ciertos metabolitos con capacidad antifúngica producidos por las BAL durante su cultivo en el medio MEGM.

Cabe destacar que se observa una clara tendencia de inhibición de crecimiento del hongo con el paso de los días, siendo más notorio con *L. plantarum* B7 que con *L. plantarum* B31; también se aprecia que los ensayos realizados en el medio MRS logran mejores resultados de inhibición de crecimiento, siendo más evidente en *L. plantarum* B31. Esto podría deberse a factores como la composición del medio de cultivo. Por ejemplo, el acetato de sodio actúa como inhibidor de algunas bacterias, levaduras y hongos (Mohammadzadeh-Aghdash et al., 2017). El medio MRS contiene una mayor concentración de acetato de sodio (5 g/L) que el medio MEGM (3.9 g/L).

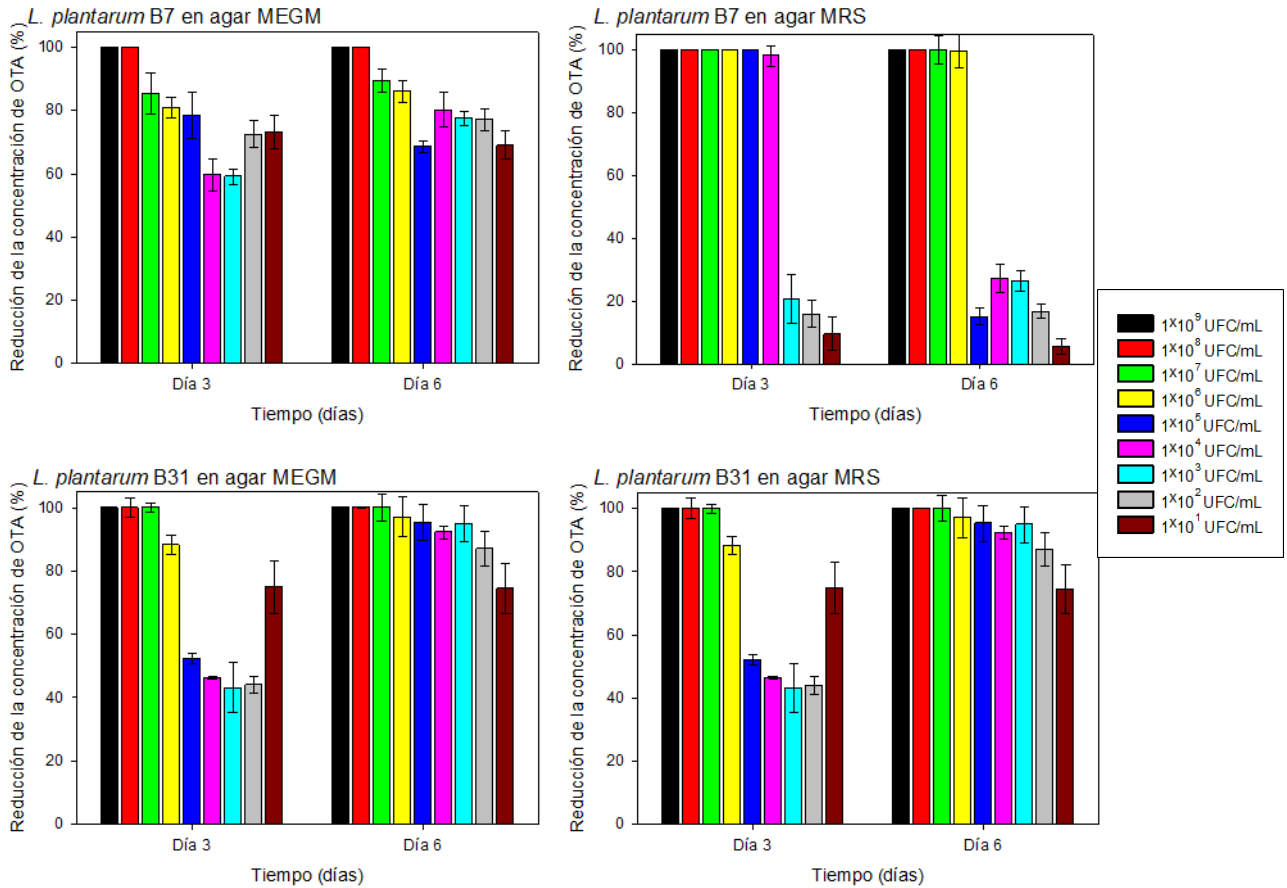
El ELC es un líquido de fermentación que contiene metabolitos extracelulares producidos por microorganismos y los nutrientes residuales del medio de cultivo. El ELC de las BAL puede tener actividad antifúngica debido a la presencia de ácidos orgánicos, ácidos grasos y compuestos proteicos, entre otros metabolitos (Mani-López et al., 2022). Numerosos estudios han evaluado la capacidad del ELC de distintas BAL contra el crecimiento de hongos. Saladino et al. (2016) evaluaron fracciones concentradas del ELC de distintas especies de *Lactobacillus* contra *A. parasiticus* hasta lograr inhibir más del 98 % del crecimiento del hongo a los siete días de cultivo. Estos autores atribuyeron el efecto inhibitorio a compuestos fenólicos, proteínas y péptidos bioactivos presentes en el medio como consecuencia

del crecimiento de las BAL (Saladino et al., 2016). Resultados similares fueron encontrados por El Oirdi et al. (2021) quienes emplearon ELC liofilizado de distintas BAL contra especies de *Aspergillus* y demostraron que el efecto inhibitor se debía a sustancias proteicas, ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno.

Los trabajos reportados muestran mejores resultados de inhibición que los encontrados en la presente investigación; sin embargo, cabe aclarar que se probaron cepas de hongos diferentes al nuestro y que el ELC probado en esas investigaciones fue concentrado, en nuestro caso se utilizó el ELC obtenido directamente del caldo de fermentación. Con nuestros resultados corroboramos que la capacidad inhibitoria de las BAL se debe a la manifestación de los distintos mecanismos de interacción discutidos previamente, pues en comparación del ensayo con el cultivo con células, la capacidad de las BAL para inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089, en los resultados con el ELC, la inhibición se vio disminuida por lo que se puso de manifiesto que el efecto inhibitorio de las BAL depende en gran medida de la presencia de las células bacterianas aunque existan otras moléculas derivadas de la fermentación que pueden participar en la inhibición (Le Lay et al., 2016; Leyva Salas et al., 2017; Sadiq et al., 2019). La utilización del caldo de cultivo íntegro para la inhibición del crecimiento fúngico evita los procesos de extracción y purificación de metabolitos producidos por las BAL con capacidad antifúngica, lo que ofrece un agente de biocontrol simple y económico contra el crecimiento de hongos ocratoxigénicos y la producción de OTA.

### 8.3.3 Inhibición de la producción de ocratoxina A en presencia de bacterias ácido lácticas

La primera parte de este ensayo tuvo como objetivo determinar el efecto de diferentes concentraciones de cada BAL (*L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31) cultivadas en el caldo MEGM sobre la producción de OTA por *A. carbonarius* Ac 089. En estos experimentos se utilizaron concentraciones de células de BAL que variaron de  $1 \times 10^1$  hasta  $1 \times 10^9$  UFC/mL. El experimento se desarrolló tanto en agar MEGM como en agar MRS bajo las mismas condiciones que en la Sección 8.3.1. La cuantificación de OTA se realizó a los días tres y seis de cultivo para calcular la reducción de la concentración de OTA (%). Los resultados se muestran en la [Figura 8.7.](#)



**Figura 8.7** - Reducción de la concentración de OTA (%) de *A. carbonarius* Ac 089 a los 3 y 6 días de cultivo con diferentes concentraciones de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31.

Bajo las condiciones experimentales se encontró un 100 % de reducción de la concentración de OTA con una concentración de  $1 \times 10^9$  a  $1 \times 10^6$  UFC/mL de *L. plantarum* B7, en agar MRS al sexto y tercer día de cultivo, respectivamente. Es decir, no se observó producción de OTA. En cambio, en agar MEGM, se estimó un 100 % de la reducción de la concentración de OTA con la concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 tanto a los tres como a los seis días de cultivo, es decir, no se observó producción de OTA. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en la Sección 8.3.1, pues al no haber crecimiento de *A. carbonarius*

Ac 089 en los medios de cultivo, no se observó producción de OTA. En este caso, el tratamiento del cultivo sin diluir fue suficiente para impedir que creciera el hongo y evitar, por lo tanto, procesos de detoxificación de OTA. No obstante, cuando se usó una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de cada cepa de BAL la reducción de la concentración de OTA fue de más de 96 % al sexto día de cultivo con *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 en ambos medios (MRS y MEGM). Los datos mostrados confirman que, un cultivo de BAL conformado tanto con células bacterianas como por sus metabolitos presentan un mayor efecto inhibitorio al tener una mayor concentración de células al inicio del cultivo sobre la producción de OTA (Adebo et al., 2021).

Cabe destacar que *L. plantarum* B7 fue más eficiente al reducir la concentración de OTA por *A. carbonarius* Ac 089 cuando se ensayó en medio MEGM que en medio MRS pues con las concentraciones de  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^7$  UFC/mL la reducción de la concentración de OTA se mantuvo por arriba de 99 % para el sexto día en agar MEGM; incluso con las células más diluidas ( $1 \times 10^1$  UFC/mL) se redujo la concentración de OTA en más del 68 %. Mientras que en medio MRS con las concentraciones de  $1 \times 10^4$  y  $1 \times 10^5$  UFC/mL la reducción de la concentración de OTA disminuyó de 98 % a 25 % y 27 %, del tercer al sexto día de cultivo y con las concentraciones más diluidas ( $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^2$  y  $1 \times 10^3$  UFC/mL) la reducción de la concentración de OTA fue menor al 20 % en el sexto día de cultivo ([Figura 8.7](#)).



En contraste, *L. plantarum* B31 se comportó de manera similar con respecto a la reducción de OTA por *A. carbonarius* Ac 089 en ambos medios (MRS y MEGM), pues la reducción de la producción de OTA fue superior al 90 % con las concentraciones de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^7$  UFC/mL y de 74 – 87 % con las concentraciones de  $1 \times 10^1$  y  $1 \times 10^2$  UFC/mL, respectivamente, para el sexto día de cultivo.

Las diferencias encontradas en los valores de inhibición pueden deberse a la composición del medio de cultivo empleado. El MEGM es un medio de cultivo elaborado a partir del germen de malta de cebada, de manera que proporciona nutrientes como carbohidratos, aminoácidos libres, ácidos grasos, así como minerales y vitaminas (Ortiz et al., 2021), todos estos elementos proporcionan a las BAL las herramientas necesarias para crecer y producir metabolitos que pueden estar involucrados en la actividad inhibitoria de la producción de OTA.

En los casos donde se observan inhibiciones de crecimiento del hongo superiores al 70 % (Figura 8.5) y de reducción de concentración de OTA superior al 90 % (Figura 8.7) puede ser debido a la competencia entre el hongo y las BAL por los nutrientes para crecer y producir metabolitos primarios; la OTA, al ser un metabolito secundario, se produce una vez que el hongo se ha desarrollado en el medio de cultivo (Venkatesh & Keller, 2019). Además, se cree que las micotoxinas fúngicas se producen en condiciones ambientales desfavorables y que se puede detener su producción cuando el hongo se enfrenta a condiciones de competencia por la disponibilidad de espacio y nutrientes (Sadiq et al., 2019).

Por otra parte, en los casos donde no se observa inhibición de crecimiento ([Figura 8.5](#)), pero sí se observa una reducción de la concentración de OTA, podría presentarse un mecanismo de detoxificación de OTA relacionado con la capacidad de las BAL para biotransformar o adsorber la OTA (Li et al., 2020; Luz et al., 2018); sin embargo, se debe realizar un análisis distinto para comprobar esta teoría.

La biotransformación de la OTA incluye mecanismos de hidroxilación, glicosilación, esterificación y dechloración; sin embargo, estos mecanismos han sido aún muy poco estudiados (Li et al., 2020). Por otro lado, la biotransformación puede incluir la biodegradación de la OTA a productos menos tóxicos como la OT $\alpha$ . La OTA consiste en una dihidroisocumarina clorada unida por un enlace amida a un grupo 7-carboxilo a la L-fenilalanina ([Figura 2.6](#)) Esta molécula puede ser hidrolizada mediante enzimas producidas por las BAL que cortan el enlace amida para generar, por una parte, el metabolito inocuo OT $\alpha$  y, por otra, la L- $\beta$ -fenilalanina (Leitão & Enguita, 2021). Algunas enzimas que tienen la capacidad de hidrolizar este enlace son las proteasas y las peptidasas, estas últimas son enzimas hidrolíticas que actúan sobre enlaces peptídicos, liberando péptidos y aminoácidos de las cadenas polipeptídicas (Li et al., 2020).

El primer reporte donde se intentó comprobar la capacidad de las BAL para biodegradar la OTA lo realizaron Piotrowska & Zakowska (2000). Encontraron que, después de 24 h de incubación, la concentración de OTA se redujo en un 37 % en presencia de *L. brevis*, 50 % con *L. sanfrancisco* y 54 % con *L. plantarum*; sin

embargo, no detectaron productos de biodegradación, por lo que atribuyeron este efecto a la adsorción en la pared celular (Piotrowska & Zakowska, 2000).

Abrunhosa et al. (2014) fueron los primeros en describir la capacidad de las cepas BAL para biodegradar la OTA, específicamente, usaron una cepa de *Pediococcus parvulus* aislada de vino. Cuantificaron la tasa de conversión de OTA a OT $\alpha$  y encontraron que esta conversión se daba en las primeras horas de cultivo con un porcentaje de degradación que varía del 50 al 90 % a las 6 y 19 h, respectivamente. La cuantificación de la OTA y la OT $\alpha$  se realizó por cromatografía de líquidos acoplada a masas (LC-MS/MS) (Abrunhosa et al., 2014).

Luz et al. (2018) evaluaron la actividad proteolítica de diferentes BAL y su capacidad de biodegradar la OTA. Las BAL que evidenciaron la mayor actividad proteolítica, fueron cepas de *L. delbrueckii*, *L. bulgaricus*, *L. paracasei* y *L. plantarum*, mismas que mostraron una alta capacidad de biodegradar la OTA. Los productos de degradación fueron analizados por LC-MS/MS con trampa de iones lineal (LC-MS/MS-LIT) e identificaron a la OT $\alpha$  y la fenilalanina como principales productos de la degradación (Luz et al., 2018).

El segundo mecanismo de detoxificación que podrían ejercer las BAL es la adsorción de OTA por moléculas ubicadas en su pared celular. Las BAL, al ser bacterias Gram-positivas, contienen una capa gruesa de peptidoglicano acompañado de otros glicopolímeros que incluyen ácidos teicoicos y proteínas

(Palomino et al., 2023). Producen una proteasa de pared celular que puede ser la responsable de la unión de moléculas como la OTA a la pared celular de las BAL (Liu et al., 2022). En los últimos años se ha reportado que algunas BAL como *L. rhamnosus*, *L. amylovorus*, *L. plantarum* y *L. pentosus* poseen la capacidad de ligar toxinas a su pared celular (Liu et al., 2022).

En un estudio llevado a cabo por Luz et al. (2018) utilizaron suspensiones de 17 BAL por separado en concentraciones de  $10^8$  UFC/mL, cultivadas en MRS contaminado con 0.6  $\mu\text{g/mL}$  de OTA para evaluar la capacidad de adsorción o biodegradación de OTA. Confirmaron, mediante LC-MS-LIT, la presencia de dos fragmentos moleculares correspondientes a productos de degradación de la OTA, el ion con  $m/z = 256.1$  que representa el peso molecular de la OT $\alpha$  y el fragmento con  $m/z = 149.0$  que representa la OT $\alpha$  con pérdida del grupo cumarínico (Luz et al., 2018).

Indudablemente, un tratamiento preventivo con células BAL sin diluir es eficaz para evitar el crecimiento de hongos ocratoxigénicos, en este caso, *A. carbonarius* Ac 089; sin embargo, un cultivo diluido de células BAL tendría la capacidad de detoxificar la OTA. Se resalta la necesidad de evaluar la capacidad de las BAL aquí estudiadas en un modelo alimenticio para ofrecer el mejor tratamiento preventivo o de detoxificación.

### 8.3.4 Inhibición de la producción de ocratoxina A con el extracto libre de células

Como ya se ha mencionado en las Secciones 8.3.1 y 8.3.3, la inhibición del crecimiento del hongo y la reducción de la concentración de OTA es multifactorial. Por ello, se evaluó el efecto del ELC de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 cultivadas en el caldo MEGM sobre la producción de OTA por *A. carbonarius* Ac 089. El experimento se desarrolló en agar MEGM y agar MRS bajo las mismas condiciones aplicadas en la Sección 8.3.1. La cuantificación de OTA se realizó a los días tres y seis de cultivo y se calculó la reducción de la concentración de OTA (%). Los resultados se muestran en la [Tabla 8.3](#).

**Tabla 8.3** - Reducción de la concentración de OTA (%) por *A. carbonarius* Ac 089 a los 3 y 6 días de cultivo con el extracto libre de células de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31.

Ensayo (ELC)	Reducción de la concentración de OTA en agar MRS (%)		Reducción de la concentración de OTA en agar MEGM (%)	
	Día 3	Día 6	Día 3	Día 6
<i>L. plantarum</i> B7	99.8±7.2	99.9±6.5	99.9±7	99.9±0.7
<i>L. plantarum</i> B31	99.7±4.3	99.9±1.4	99.9±2.6	99.9±5.1

Bajo las condiciones experimentales ensayadas, la reducción de la concentración de OTA de *A. carbonarius* Ac 089 fue de más del 99 % en todos los tratamientos, con ambas bacterias en los dos medios de cultivo utilizados ([Tabla 8.3](#)). En cambio, bajo las mismas condiciones, la inhibición del crecimiento del hongo fue menor al

50 % en todos los casos ([Figura 8.6](#)). Este comportamiento resulta interesante pues se observa que, al no existir células BAL en los tratamientos realizados en esta parte del proyecto, se puede sugerir que los metabolitos producidos por ambas BAL poseen un efecto mucho mayor contra la producción de OTA que en contra el hongo en sí mismo. Por consiguiente, se piensa que ciertos metabolitos de las BAL podrían tener la capacidad de detoxificar la OTA mediante mecanismos de biotransformación principalmente, como se ha explicado anteriormente.

Lo anterior concuerda con un estudio conducido por Guimarães et al. (2018) quienes probaron ELC de *L. plantarum* UM55 y *L. buchneri* UTAD104 frente al crecimiento radial de *Penicillium nordicum* y la producción de OTA. El crecimiento radial del hongo se inhibió en menos del 20 %, pero la producción de OTA se redujo en aproximadamente un 60 %. Caracterizaron los ácidos orgánicos que contenía el ELC de *L. plantarum* UM55 y encontraron ácido láctico, ácido fenil láctico, ácido hidroxifenil láctico y ácido indol láctico, mientras que el ELC de *L. buchneri* UTAD104 contenía ácido acético, ácido láctico y ácido fenil láctico. Además, evaluaron la actividad inhibitoria de las células de las BAL. *L. buchneri* UTAD104 inhibió la producción de OTA por completo, pero el crecimiento de los hongos solo se inhibió por completo con las concentraciones más altas de células (Guimarães et al., 2018).

Esto concuerda con los resultados obtenidos en la presente tesis, pues con las concentraciones celulares de  $1 \times 10^9$  UFC/mL se inhibió el 100 % del crecimiento del hongo y, por ende, no hubo producción de OTA ([Figura 8.5](#) y [Figura 8.7](#)).

En otro estudio, Sheata et al. (2019) evaluaron la capacidad del ELC de una cepa de *Lactobacillus* sp. RM1, aislada de leche fermentada tradicional egipcia (Rayeb), de inhibir el crecimiento de algunas especies de *Aspergillus* y la producción de AFB1 y OTA. Analizaron el ELC de la cepa e identificaron y cuantificaron siete compuestos bioactivos: éster metílico del ácido 6-octadecenoico (26 %), éster metílico del ácido hexadecanoico (7.6 %), 2,4-di-*tert*-butilfenol o 2,4-bis(1,1-dimetiletil) fenol (7 %), (Z)-7-hexadecenal (5.9 %), pentadecano (4.1 %), dotriacontano (2.5 %) y 2-metildecano (1.3 %). Se logró una inhibición completa de la producción de AFB1 y OTA con una concentración de ELC de 15 mg/mL en caldo extracto de levadura sacarosa (YES) semisintético. Este mismo ELC fue usado en granos de trigo contaminados con *A. parasiticus* y su crecimiento micelial se inhibió completamente después de dos semanas de incubación (Shehata et al., 2019).

Es importante determinar si algún metabolito producido por las BAL (presumiblemente proteasas) es responsable de biodegradar la OTA; sin embargo, en el presente estudio no se logró determinar con precisión la presencia de algún producto de biodegradación de la OTA, por lo que sería interesante investigar a profundidad esta hipótesis con las condiciones aquí realizadas, pues existen muchos reportes que mencionan la capacidad de las BAL para biodegradar la OTA. Cabe destacar que los resultados del presente trabajo son muy prometedores con respecto a la reducción de la concentración de OTA por parte de *A. carbonarius* Ac 089 y que resultó ser más efectivo el efecto del ELC que las concentraciones más diluidas de las BAL ([Figura 8.7](#)). De esta forma, se atribuye el efecto inhibitorio a los

metabolitos producidos por las BAL; sin embargo, es importante recordar que el tratamiento con altas concentraciones celulares de BAL es muy efectivo contra el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089, por consiguiente, contra la producción de OTA confirmando que esta acción se puede deber a un mecanismo sinérgico.

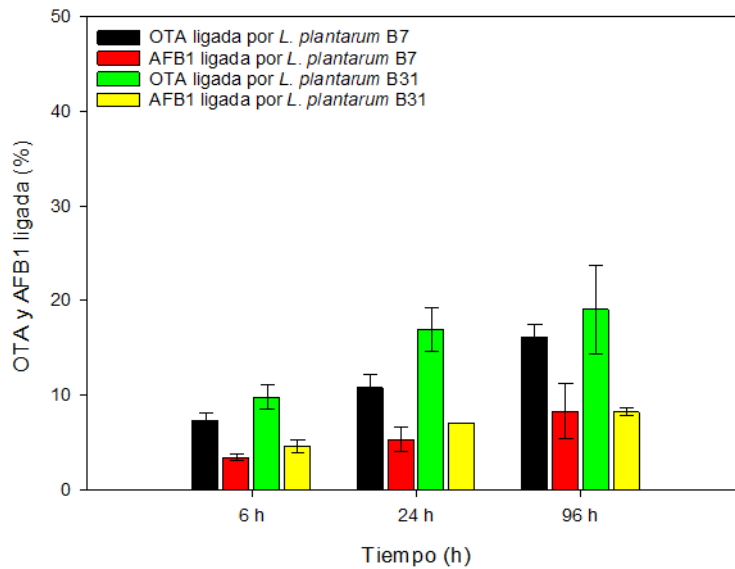
## 8.4 Adsorción de micotoxinas por bacterias ácido lácticas

### 8.4.1 Adsorción de micotoxinas por células viables

Con el fin de entender la capacidad de adsorción de las BAL sobre la OTA, se realizaron experimentos para determinar si *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 eran capaces de adsorber la OTA producida por *A. carbonarius* Ac 089. Además, se pretendió evaluar el uso de las BAL aquí probadas sobre la detoxificación de la aflatoxina B1 que es otra de las micotoxinas existentes más dañinas para la salud humana.

El ensayo consistió en poner en contacto a *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 con la AFB1 y la OTA durante 4 días. Se tomaron muestras a las 0, 6, 24 y 96 h de cultivo. Se extrajo cada micotoxina tanto del pellet (células) y del sobrenadante (ELC) para determinar la micotoxina ligada (%). Los resultados de la adsorción de la OTA y de la AFB1 se presentan en la [Figura 8.8](#).





**Figura 8.8** - OTA y AFB1 ligada (%) en las células de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 a las 6, 24 y 96 h de cultivo.

Los resultados obtenidos muestran que ambas cepas de BAL, *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31, adsorbieron la OTA a 16 y 19 %, respectivamente a las 96 h de cultivo; en cambio, para la AFB1 la adsorción por ambas BAL fue del 8 % a las 96 h de cultivo.

Las BAL usadas en este estudio mostraron una baja capacidad para adsorber la AFB1. Existen diferentes factores que intervienen en el proceso de adsorción como lo son el tipo de cepa, la concentración bacteriana, el periodo de incubación, la temperatura, el pH, la composición del medio de cultivo, la concentración de la micotoxina ensayada, entre otros (Liu et al., 2022). Entre los factores más importantes a tomar en cuenta para que se lleva a cabo la adsorción de la AFB1 por

la BAL se encuentran las características de los sitios de adhesión que la rodea y la cantidad de bacterias presentes (Hernandez-Mendoza et al., 2009).

Existen algunos reportes que documentan la capacidad de adsorción de AFB1 por algunas BAL. Hernandez-Mendoza et al. (2009) probaron la capacidad de ocho cepas de *L. casei* para unirse a la AFB1 en solución acuosa. Las cepas exhibieron diferentes grados de unión a la aflatoxina; bajo sus condiciones experimentales la mayor concentración de AFB1 unida fue de 49.2 % con  $2 \times 10^9$  -  $3 \times 10^9$  UFC/mL. Según un estudio de Rämö et al. (2022), *L. plantarum* redujo en un 90 % el nivel de AFB1 en una suspensión de habas (Rämö et al., 2022). Finalmente, Zolfaghari et al. (2023) mencionaron que las células bacterianas con pared celular lesionada o destruida en comparación con una completamente sana y sin sitios de unión, puede revelar otros sitios de conexión para la unión de aflatoxinas a los compuestos de la pared celular y la membrana plasmática de las bacterias. Con base en esta información, puede ser interesante explorar para futuras investigaciones el uso de células bacterianas de BAL inactivas para evaluar su capacidad de adsorción de AFB1.

Por otra parte, se ha reportado que ciertas BAL presentan un mecanismo de secuestro de la OTA en su pared celular, debido principalmente a la naturaleza hidrofóbica de la pared celular bacteriana y a las interacciones electrostáticas por acción de componentes de la pared celular como el ácido teicoico (Bangar et al., 2022; Sadiq et al., 2019).

En un estudio conducido por Luz et al. (2018) evaluaron la capacidad para distintas BAL, entre ellas *L. plantarum*, para adsorber la OTA a distintos valores de pH. Estos autores encontraron que a pH 6.5 las cepas mostraron una capacidad de adsorción de la OTA entre 32 y 45 ppb (Luz et al., 2018).

En un trabajo reciente, Simões et al. (2023) evaluaron 14 cepas de BAL aisladas de aceitunas de mesa brasileñas fermentadas naturalmente para la inhibición del crecimiento y producción de micotoxinas de *A. flavus*, *A. carbonarius*, *P. nordicum* y *P. expansum*. Las BAL analizadas mostraron capacidad de adsorción de OTA de 28 a 33 %. Asimismo, evaluaron la capacidad de adsorción de otras micotoxinas, la patulina y la AFB1 con 23-24 % y 48-51 % de adsorción, respectivamente (Simões et al., 2023).

Por otro lado, la capacidad de unión de la OTA a las BAL parece estar estrechamente relacionada con el estado de las células pues se ha reportado que células no viables son capaces de adsorber mayor cantidad de la OTA que las células viables (Abedi et al., 2022).

Abedi et al. (2022) evaluaron la capacidad de unión y la estabilidad de la OTA en cultivos viables y no viables de BAL usadas como cultivos iniciadores de masa madre y cuantificaron la hidrofobicidad de la pared celular de las BAL. La capacidad de adsorción de OTA encontrada en las BAL fue de 39 a 53 % en células viables y los valores de hidrofobicidad de las células viables oscilaron entre 35 – 40 % lo que

corresponde a una baja hidrofobicidad en la superficie de la BAL viables. Por el contrario, las células inactivadas fueron más efectivas en la retención de OTA (59 – 70 %), lo que se atribuyó a un aumento en los valores de hidrofobicidad de las células que oscilaron entre 60 y 72 %. Este cambio en la disminución de la OTA (%) revela que el aumento en la hidrofobicidad en la superficie de las células inactivas es responsable de la unión de las micotoxinas (Abedi et al., 2022).

En este sentido, se llevaron a cabo ensayos para determinar si las células no viables de BAL poseen la capacidad de secuestrar la OTA con mayor eficiencia.

#### 8.4.2 Adsorción de micotoxinas por células no viables

Las BAL podrían disminuir la producción de la OTA no solo en una fase de crecimiento activo, sino también pueden contribuir a la descontaminación por adsorción como ocurre con la biomasa inactiva (Abedi et al., 2022). Se ha reportado que la viabilidad de las células bacterianas tiene un impacto en su capacidad para secuestrar OTA (Piotrowska, 2014) basada en los cambios en hidrofobicidad que sufren las células cuando mueren. Las células de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 fueron sometidas a calor y sonicación con el fin de obtener células no viables y evaluar su capacidad de adsorber la OTA.

Desde el tiempo inicial de contacto de las células no viables de *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 con la OTA, se recuperó el 100 % de la micotoxina en las células inactivas de cada cepa y se mantuvo así durante las 96 h de contacto. Las BAL no

viables analizadas en este estudio tuvieron una capacidad de secuestro de la OTA de seis a nueve veces mayor que las células viables.

Una mayor unión de OTA por parte de células muertas en lugar de células vivas puede ser propiciada por cambios en la pared celular bacteriana causados por altas temperaturas. La desnaturalización de proteínas y la generación de poros inducida por altas temperaturas dan como resultado una mayor permeabilidad de las capas externas ubicadas en la pared celular. De hecho, una gran cantidad de sitios activos serán responsables de la adsorción de compuestos que aumentan con la desnaturalización y exponen el núcleo hidrofóbico interno (Abedi et al., 2022). Se ha reportado que cuando se producen niveles más altos de sonoporación irreversible pueden causar la fuga de constituyentes celulares debido a la alteración física y/o la alternancia de la bicapa lipídica de la membrana celular, como consecuencia de la muerte celular (Ojha et al., 2017). Además, cuando se aplica ultrasonido, los radicales libres formados (OH y H) inducidos por la disociación de las moléculas de agua que promueven las burbujas cavitacionales pueden contribuir a la modificación química de la pared celular bacteriana (Zhu, 2015). Estas perturbaciones de la pared celular bacteriana pueden facilitar la unión de OTA a la pared celular y al contenido de la membrana plasmática que no están disponibles cuando la célula bacteriana está viva (Abedi et al., 2022; Zhu, 2015).

Los resultados de la presente tesis demuestran que las células inactivadas de BAL fueron más efectivas en la eliminación de OTA que las células activas, lo que revela

que es probable que las propiedades hidrofóbicas de la superficie podrían ser responsables de la adhesión de las micotoxinas. En el caso de las células viables el efecto de adsorción fue menor, pero puede asociarse presumiblemente a la presencia de los llamados bolsillos hidrófobos en la superficie de las células (Sheikh et al., 2018).

## 9 ► Conclusiones

En el presente trabajo se investigó la capacidad de las cepas de BAL *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 para inhibir el crecimiento y reducir la concentración de ocratoxina A (OTA) de *A. carbonarius* Ac 089. En una primera etapa se propuso un nuevo modelo que describe adecuadamente la fase de crecimiento exponencial con ensayos en un medio formulado con EGM. El modelo de Gompertz acoplado al modelo de Luedeking-Piret describió adecuadamente el crecimiento de *L. plantarum* B31. Se concluyó que la producción del ácido láctico está principalmente asociada al crecimiento de la biomasa. Se evaluó el uso del medio con EGM para el crecimiento de seis BAL para generar biomasa y metabolitos capaces de inhibir el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 así como de reducir la concentración de OTA. De estas seis cepas de BAL, dos de ellas presentaron el mejor crecimiento en el medio MEGM: *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31. Dichas cepas fueron capaces de inhibir al 100 % de crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 y de reducir la concentración de OTA con un cultivo iniciador de  $1 \times 10^9$  UFC/mL, de manera que el medio de cultivo no sólo proporcionó los nutrientes necesarios para hacer crecer a las BAL, sino también para favorecer la inhibición del crecimiento y disminuir la concentración de OTA de *A. carbonarius* AC 089.

El ELC tanto de *L. plantarum* B7 como de *L. plantarum* B31, inhibió el crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 entre un 30 y 40 %. En cambio, la disminución de la concentración de OTA por *A. carbonarius* Ac 089 fue de más del 99 % con el ELC de *L. plantarum* B7 y el ELC de *L. plantarum* B31 en agar MEGM. Con base en los resultados obtenidos se concluye que un cultivo de BAL es más eficiente para inhibir el crecimiento y reducir la concentración de OTA cuando contiene tanto a las células como a sus metabolitos, a una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL de *L. plantarum* B7 y/o *L. plantarum* B31 para lograr tanto la inhibición completa de crecimiento de *A. carbonarius* Ac 089 como la reducción de OTA.

Se comprobó que *L. plantarum* B7 y *L. plantarum* B31 fueron capaces de adsorber la OTA producida por *A. carbonarius* Ac 089 en un 100 % cuando se utilizaron las células no viables, mientras que las células viables presentan una forma distinta de detoxificación, como la biotransformación, aunque eso debe de ser corroborado posteriormente.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que el mecanismo empleado por las BAL para inhibir el crecimiento y la producción de OTA por parte del hongo es de naturaleza multifactorial ya que involucra diferentes mecanismos como la participación de la pared celular de las BAL, la producción de metabolitos antifúngicos y la competencia por nutrientes y espacio. Así mismo, mecanismos como la adsorción y la biotransformación de la OTA por células no



viabiles y viabiles de BAL se suman a los elementos responsables de la disminución de la concentración de la OTA.

Los hallazgos obtenidos en este estudio pueden ser la base para plantear una estrategia de biocontrol de hongos ocratoxigénicos mediante el uso de BAL cultivadas en un medio formulado con EGM de manera amigable con el medio ambiente.

## 10 ▶ Referencias

- Abedi, E., Mousavifard, M., & Hashemi, S. M. B. (2022). Ultrasound-Assisted Detoxification of Ochratoxin A: Comparative Study of Cell Wall Structure, Hydrophobicity, and Toxin Binding Capacity of Single and Co-culture Lactic Acid Bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 15(3), 539–560. <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02767-7>
- Abraham, N., Chan, E. T. S., Zhou, T., & Seah, S. Y. K. (2022). Microbial detoxification of mycotoxins in food. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.957148>
- Abrunhosa, L., Inês, A., Rodrigues, A. I., Guimarães, A., Pereira, V. L., Parpot, P., Mendes-Faia, A., & Venâncio, A. (2014). Biodegradation of ochratoxin A by *Pediococcus parvulus* isolated from Douro wines. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 45–52. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2014.07.019>
- Adebo, O. A., Molelekoa, T., Makhuvele, R., Adebisi, J. A., Oyedeji, A. B., Gbashi, S., Adefisoye, M. A., Ogundele, O. M., & Njobeh, P. B. (2021). A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction. *International Journal of Food Science & Technology*, 56(1), 13–27. <https://doi.org/10.1111/IJFS.14734>
- Alshannaq, A., & Yu, J. H. (2017). Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/ijerph14060632>
- Amador Hernández, U. (2019). *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.
- Ankita Chatterjee, Jayanthi Abraham, (2018) Chapter 2 - Microbial Contamination, Prevention, and Early Detection in Food Industry, Editor(s): Alina Maria Holban, Alexandru Mihai Grumezescu, En Handbook of Food Bioengineering, Microbial Contamination and Food Degradation, Academic Press, 21-47, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811515-2.00002-0>.
- Arroyo, F. N., Durán Quintana, M. C., & Fernández, A. G. (2005). Evaluation of Primary Models To Describe the Growth of *Pichia anomala* and Study of Temperature, NaCl, and pH Effects on Its Biological Parameters by Response Surface Methodology. *Journal of Food Protection*, 68(3), 562–570. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.3.562>

- Arumugam, T., Ghazi, T., & Chuturgoon, A. A. (2021). Molecular and epigenetic modes of Fumonisin B1 mediated toxicity and carcinogenesis and detoxification strategies. *Critical Reviews in Toxicology*, 51(1), 76–94. <https://doi.org/10.1080/10408444.2021.1881040>
- Awuchi, C. G., Ondari, E. N., Eseoghene, I. J., Twinomuhwezi, H., Amagwula, I. O., & Morya, S. (2022). Fungal Growth and Mycotoxins Production: Types, Toxicities, Control Strategies, and Detoxification. *Fungal Reproduction and Growth*, IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.100207>
- Ayivi, R. D., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S. O., Worku, M., Tahergorabi, R., Silva, R. C. da, & Ibrahim, S. A. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1 (3), 202-232. <https://doi.org/10.3390/DAIRY1030015>
- Bangar, S. P., Sharma, N., Bhardwaj, A., & Phimolsiripol, Y. (2022). Lactic acid bacteria\_ A bio-green preservative against mycotoxins for food safety and shelf-life extension. *Quality Assurance and Safety of Crops and Foods*, 14(2), 13–31. <https://doi.org/10.15586/QAS.V14I2.1014>
- Barzegar, F., Kamankesh, M., & Mohammadi, A. (2023). Recent Development in Formation, Toxic Effects, Human Health and Analytical Techniques of Food Contaminants. *Food Reviews International*, 39(2), 1157–1183. <https://doi.org/10.1080/87559129.2021.1929303>
- Bedimo, J. A. M., Njiayouom, I., Biéysse, D., Nkeng, M. N., Cilas, C., & Nottéghem, J. L. (2008). Effect of Shade on Arabica Coffee Berry Disease Development: Toward an Agroforestry System to Reduce Disease Impact. *Phytopathology*®, 98(12), 1320–1325. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-98-12-1320>
- Borém, F. M., & de Andrade, E. T. (2019). Processing and Drying of Coffee. In *Drying and Roasting of Cocoa and Coffee* (141–170). CRC Press, Florida. <https://doi.org/10.1201/9781315113104-6>
- Carr, F. J., Chill, D., & Maida, N. (2002). The Lactic Acid Bacteria: A Literature Survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281–370.
- Cheng, K. K., Zeng, J., Jian, J. H., Zhu, J. F., Zhang, G. X., & Liu, D. H. (2019). Model-based temperature control for improving lactic acid production from glycerol. *RSC Advances*, 9(21), 11614. <https://doi.org/10.1039/C9RA01323G>
- Code of Practice Prevention of Mould Formation. *Enhancement of coffee quality through prevention of mould formation*. (2002). European Coffee Federation. <https://www.ecf-coffee.org/wp-content/uploads/2020/09/Code-of-Practice-Prevention-of-Mould-Formation.pdf>
- Coghetto, C. C., Vasconcelos, C. B., Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2016). *Lactobacillus plantarum* BL011 cultivation in industrial isolated soybean protein

- acid residue. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(4), 941–948. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.06.003>
- Dalié, D. K. D., Deschamps, A. M., & Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. In *Food Control*. 21(4), 370–380). <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>
- De Man, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A Medium for the Cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>
- Deseure, J., Obeid, J., Willison, J. C., & Magnin, J.-P. (2021). Reliable determination of the growth and hydrogen production parameters of the photosynthetic bacterium *Rhodobacter capsulatus* in fed batch culture using a combination of the Gompertz function and the Luedeking-Piret model. *Heliyon*, 7(7), e07394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07394>
- Di Biase, M., Le Marc, Y., Bavaro, A. R., Lonigro, S. L., Verni, M., Postollec, F., & Valerio, F. (2022). Modeling of Growth and Organic Acid Kinetics and Evolution of the Protein Profile and Amino Acid Content during *Lactiplantibacillus plantarum* ITM21B Fermentation in Liquid Sourdough. *Foods*, 11(23). <https://doi.org/10.3390/foods11233942>
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhali Mirleau, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A., & Roussos, S. (2011). 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>
- Domínguez-Gutiérrez G. A., Celli Martin, Rodríguez-Serrano G., & Saucedo-Castañeda G. (2023a). Modelamiento del crecimiento y producción de ácido láctico de bacterias lácticas usando el modelo de Gompertz y Luedeking-Piret. *Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería*, 18(2), 200. <https://maxima.sourceforge.io>
- Domínguez-Gutiérrez, G. A., Perraud-Gaime, I., Escalona-Buendía, H., Durand, N., Champion-Martínez, E. I., Fernández-Soto, R. R., Saucedo-Castañeda, G., & Rodríguez-Serrano, G. (2023b). Inhibition of *Aspergillus carbonarius* growth and Ochratoxin A production using lactic acid bacteria cultivated in an optimized medium. *International Journal of Food Microbiology*, 404, 110320. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>
- European Commission. (2023). Commission Regulation (EU) 2023/915 of 25 April 2023 on maximum levels for certain contaminants in food and repealing Regulation (EC) No 1881/2006. *Official Journal of the European Union*, 5.5.2023.

- European Union. (2021). *Reglamento (CE) n° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo*. (Vol. 16)
- Fan, R., Ebrahimi, M., & Czermak, P. (2017). Anaerobic Membrane Bioreactor for Continuous Lactic Acid Fermentation. *Membranes* 2017, 7(2), 26. <https://doi.org/10.3390/MEMBRANES7020026>
- Fan, R., Ebrahimi, M., Quitmann, H., Aden, M., & Czermak, P. (2016). An Innovative Optical Sensor for the Online Monitoring and Control of Biomass Concentration in a Membrane Bioreactor System for Lactic Acid Production. *Sensors* 2016, 16(3), 411. <https://doi.org/10.3390/S16030411>
- FAO-CFC-AFCASOLE. (2017). *Directrices para prevenir la formación de moho en el café*. <http://dev.ico.org/documents/ed1988c.pdf>
- Fernández, M., & Zúñiga, M. (2006). Amino acid catabolic pathways of lactic acid bacteria. In *Critical Reviews in Microbiology*. 32(3), 155–183. <https://doi.org/10.1080/10408410600880643>
- Fernández Pinto, V. E., & Patriarca, A. (2017). *Alternaria* Species and Their Associated Mycotoxins. In A. Moretti & A. Susca (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi Methods and Protocols Methods in Molecular Biology* (13–32). Springer Science+Business Media LLC 2017.
- Ferreira, T., Joel, S., Rubens, G., & Farah, A. (2019). Introduction to Coffee Plant and Genetics. In A. Farah (Ed.), *Coffee: Production, Quality and Chemistry* (Ilustrada, 1–25). The Royal Society of Chemistry. [https://books.google.com/books/about/Coffee.html?hl=es&id=SRSEDwAAQB\\_AJ](https://books.google.com/books/about/Coffee.html?hl=es&id=SRSEDwAAQB_AJ)
- Fiscal-Arjona, M. (2019). Food safety during preharvest, harvesting, and postharvest. In *Food safety: contaminants and toxins* (141–167). Arcler Education Incorporated, 2018. Delve publishing.
- Fung, F., Wang, H. S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical Journal*, 41(2), 88–95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
- Gänzle, M. G. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106–117. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2015.03.001>
- Gao, X., Qiao, S. Y., & Lu, W. Q. (2009). Determination of an economical medium for growth of *Lactobacillus fermentum* using response surface methodology. *Letters in Applied Microbiology*, 49(5), 556–561. <https://doi.org/10.1111/J.1472-765X.2009.02705.X>

- García-Lara, S. (2010). Cereal Grains: Properties, Processing and Nutritional Attributes. *Crop Science*, 50(6), 2649–2650. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.12.0005br>
- Ghimire, A., Kumar Sah, A., & Poudel, R. (2020). Kinetics and modeling of growth and lactic acid production in Gundruk, a Himalayan fermented vegetable dish. *Food Science & Nutrition*, 8(10), 5591. <https://doi.org/10.1002/FSN3.1854>
- Giraffa, G. (2014). Overview of the ecology and biodiversity of the LAB. In I. John Wiley & Sons (Ed.), *Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy*, 45–54. <https://doi.org/10.1002/9781118655252.ch4>
- Guimarães, A., Venancio, A., & Abrunhosa, L. (2018). Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 35(9), 1803–1818. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1500718>
- Gunasekaran, V. (2023). A Critique of Biosafety Governance in Genetically Modified Crops. *Journal of Management & Public Policy*, 15(1), 16–32. <https://doi.org/10.47914/JMPP.2023.V15I1.002>
- Gupta, G., Labrie, S., & Filteau, M. (2024). Systematic Evaluation of Biotic and Abiotic Factors in Antifungal Microorganism Screening. *Microorganisms*, 12(7), 1396. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071396>
- Han, X., Huangfu, B., Xu, T., Xu, W., Asakiya, C., He, X., & Huang, K. (2022). Research Progress of Safety of Zearalenone: A Review. *Toxins*, 14(6). <https://doi.org/10.3390/TOXINS14060386>
- Hernandez-Mendoza, A., Garcia, H. S., & Steele, J. L. (2009). Screening of *Lactobacillus casei* strains for their ability to bind aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1064–1068. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.01.042>
- (IARC), I. A. for R. on C. (2012). Mycotoxins and human health. *IARC Scientific Publications*, 158, 87–104.
- Juárez-Tomás, M. S., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macías, M. E. F. (2010). Optimization of low-cost culture media for the production of Biomass and Bacteriocin by a Urogenital *Lactobacillus salivarius* Strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 2–11. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9037-4>
- Khodaei, D., Javanmardi, F., & Khaneghah, A. M. (2021). The global overview of the occurrence of mycotoxins in cereals: a three-year survey. *Current Opinion in Food Science*, 39, 36–42. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.012>
- Kok, Y. J., Ye, L., Muller, J., Ow, D. S. W., & Bi, X. (2018). Brewing with malted barley or raw barley: what makes the difference in the processes? *Applied*



- Microbiology and Biotechnology* 2018 103:3, 103(3), 1059–1067.  
<https://doi.org/10.1007/S00253-018-9537-9>
- Kowalczyk, M., Mayo, B., Fernández, M., & Aleksandrak-Piekarczyk, T. (2015). Updates on Metabolism in Lactic Acid Bacteria in Light of “Omic” Technologies. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications: Second Edition*, 1–24. <https://doi.org/10.1002/9781118868386.ch1>
- Kumar, S. (2020). Plant Breeding Methods. In N. P. agency India (Ed.), *Merging Plant Breeding Methods* (1–40).
- Lahtinen, S., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & Wright, A. Von. (2012). *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (Taylor & Francis, Ed.; 4th ed.). CRC Press.
- Le Lay, C., Coton, E., Le Blay, G., Chobert, J.-M., Haertlé, T., Choiset, Y., Van Long, N. N., Meslet-Cladière, L., & Mounier, J. (2016). Identification and quantification of antifungal compounds produced by lactic acid bacteria and propionibacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 239, 79–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.06.020>
- Lee, H. J., Kim, H. D., & Ryu, D. (2024). Practical Strategies to Reduce Ochratoxin A in Foods. *Toxins*, 16(1). <https://doi.org/10.3390/TOXINS16010058>
- Leitão, A. L., & Enguita, F. J. (2021). Systematic structure-based search for ochratoxin-degrading enzymes in proteomes from filamentous fungi. *Biomolecules*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/biom11071040>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. In *Microorganisms* 5(3), 37. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030037>
- Li, E., & Mira De Orduña, R. (2010). A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyzer with an infrared heating source and an analytical balance. *Letters in Applied Microbiology*, 50(3), 283–288. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2009.02789.x>
- Li, P., Su, R., Yin, R., Lai, D., Wang, M., Liu, Y., & Zhou, L. (2020). Detoxification of mycotoxins through biotransformation. *Toxins*, 12(2), 1–37. <https://doi.org/10.3390/toxins12020121>
- Li, Q., Zeng, X., Fu, H., Wang, X., Guo, X., & Wang, M. (2023). *Lactiplantibacillus plantarum*: A comprehensive review of its antifungal and anti-mycotoxic effects. *Trends in Food Science and Technology*, 136, 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2023.04.019>
- Li, T., Su, X., Qu, H., Duan, X., & Jiang, Y. (2022). Biosynthesis, regulation, and biological significance of fumonisins in fungi: current status and prospects.

- Critical Reviews in Microbiology*, 48(4), 450–462.  
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1979465>
- Li, W., Wu, Q., Kwok, L. yu, Zhang, H., Gan, R., & Sun, Z. (2023). Population and functional genomics of lactic acid bacteria, an important group of food microorganism: Current knowledge, challenges, and perspectives. *Food Frontiers*, 5, 3–23. <https://doi.org/10.1002/fft2.321>
- Liu, B., Yang, M., Qi, B., Chen, X., Su, Z., & Wan, Y. (2010). Optimizing l-(+)-lactic acid production by thermophile *Lactobacillus plantarum* As.1.3 using alternative nitrogen sources with response surface method. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2–3), 212–219. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2010.08.013>
- Liu, L., Xie, M., & Wei, D. (2022). Biological Detoxification of Mycotoxins: Current Status and Future Advances. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3). <https://doi.org/10.3390/IJMS23031064>
- Los, A., Ziuzina, D., & Bourke, P. (2018). Current and Future Technologies for Microbiological Decontamination of Cereal Grains. *Journal of Food Science*, 83(6), 1484–1493. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14181>
- Luedeking, R., & Piret, E. L. (1959). A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*, 1(4), 393–412. <https://doi.org/10.1002/jbmt.390010406>
- Luz, C., Ferrer, J., Mañes, J., & Meca, G. (2018). Toxicity reduction of ochratoxin A by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology*, 112, 60–66. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.12.030>
- Malir, F., Ostry, V., Pfohl-Leszkowicz, A., Malir, J., & Toman, J. (2016). Ochratoxin A: 50 years of research. In *Toxins*, 8(7), 191. <https://doi.org/10.3390/toxins8070191>
- Mani-López, E., Arrijoa-Bretón, D., & López-Malo, A. (2022). The impacts of antimicrobial and antifungal activity of cell-free supernatants from lactic acid bacteria in vitro and foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 604–641. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12872>
- Mannaa, M., Han, G., Seo, Y.-S., & Park, I. (2021). Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota. *Foods*, 10(11), 2861. <https://doi.org/10.3390/foods10112861>
- Manzoor, A., Qazi, J. I., Haq, I. U., Mukhtar, H., & Rasool, A. (2017). Significantly enhanced biomass production of a novel bio-therapeutic strain *Lactobacillus plantarum* (AS-14) by developing low cost media cultivation strategy. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13036-017-0059-2>



- 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>
- Melvin, S. S., Kanimozhi, J., Saptashwa, D., Narendhar, C., Ramachandran, B., & Ethiraj, S. (2021). Detection, Contamination, Toxicity, and Prevention Methods of Ochratoxins: An Update Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(46), 13974–13989. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.1C05994>
- Messens, W., Verluyten, J., Leroy, F., & De Vuyst, L. (2003). Modelling growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 in response to temperature and pH values used for European sausage fermentation processes. *International Journal of Food Microbiology*, 81(1), 41–52. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00168-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00168-X)
- Meulenbergh, E. P. (2016). Ochratoxin: An overview. En *Ochratoxins: Biosynthesis, Detection and Toxicity* ELTI Support VOF, Malden, The Netherlands) pp. 1-34.
- Mohammadzadeh-Aghdash, H., Ezzati Nazhad Dolatabadi, J., Dehghan, P., Panahi-Azar, V., & Barzegar, A. (2017). Multi-spectroscopic and molecular modeling studies of bovine serum albumin interaction with sodium acetate food additive. *Food Chemistry*, 228, 265–269. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.01.149>
- Moretti, A., & Susca, A. (Eds.). (2017). *Mycotoxigenic Fungi*. Moretti, A., Susca, A. (eds), 1542. Humana Press, New York, NY <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0>
- Mousavi Khaneghah, A., Fakhri, Y., Gahrue, H. H., Niakousari, M., & Sant'Ana, A. S. (2019). Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, 91, 95–105. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2019.06.007>
- Mozzi, F. (2015). Lactic Acid Bacteria. *Encyclopedia of Food and Health*, Editor(s): Benjamin Caballero, Paul M. Finglas, Fidel Toldrá, Academic Press, 501–508. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00414-1>
- Murtaza, B., Li, X., Dong, L., Javed, M. T., Xu, L., Saleemi, M. K., Li, G., Jin, B., Cui, H., Ali, A., Wang, L., & Xu, Y. (2022). Microbial and enzymatic battle with food contaminant zearalenone (ZEN). *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(12), 4353–4365. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-12009-7>
- Narvhus, J. A., & Axelsson, L. (2003). LACTIC ACID BACTERIA. In *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition*. Editor(s): Benjamin Caballero, Academic Press, (pp. 3465–3472). <https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00673-8>

- Onyeaka, H., Ghosh, S., Obileke, K., Miri, T., Odeyemi, O. A., Nwaiwu, O., & Tamasiga, P. (2024). Preventing chemical contaminants in food: Challenges and prospects for safe and sustainable food production. *Food Control*, 155, 110040. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2023.110040>
- Orla-Jensen, S. (1919). *The Lactic Acid Bacteria* (Andr. Fred. Host and Son, Copenhagen).
- Ortiz, L. T., Velasco, S., Treviño, J., Jiménez, B., & Rebolé, A. (2021). Changes in the Nutrient Composition of Barley Grain (*Hordeum vulgare* L.) and of Morphological Fractions of Sprouts. *Scientifica*, 2021, 1–7. <https://doi.org/10.1155/2021/9968864>
- Ostry, V., Malir, F., Toman, J., & Grosse, Y. (2017). Mycotoxins as human carcinogens-the IARC Monographs classification. *Mycotoxin Research*, 33, 65–73. <https://doi.org/10.1007/s12550-016-0265-7>
- Palomino, M. M., Allievi, M. C., Gordillo, T. B., Bockor, S. S., Fina Martin, J., & Ruzal, S. M. (2023). Surface layer proteins in species of the family *Lactobacillaceae*. *Microbial Biotechnology*, 16(6), 1232–1249. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.14230>
- Pedersen, M. B., Gaudu, P., Lechardeur, D., Petit, M. A., & Gruss, A. (2012). Aerobic respiration metabolism in lactic acid bacteria and uses in biotechnology. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(1), 37–58. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101255>
- Perrone, G., & Gallo, A. (2017). *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. In A. Moretti & S. Antonia (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. 1542, 33–49. Springer Science+Business Media LLC. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_3/TABLES/2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_3/TABLES/2)
- Perrone, G., & Susca, A. (2017). *Penicillium* species and their associated mycotoxins. In A. Moretti & S. Antonia (Eds.), *Mycotoxigenic Fungi: Methods and Protocols*. 1542, pp. 107–119. Springer Science+Business Media LLC. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6707-0_5)
- Piotrowska, M. (2014). The adsorption of ochratoxin a by *Lactobacillus* species. *Toxins*, 6(9), 2826–2839. <https://doi.org/10.3390/toxins6092826>
- Piotrowska, M., & Zakowska, Z. (2000). The biodegradation of ochratoxin A in food products by lactic acid bacteria and baker's yeast. *Progress in Biotechnology*, 17(C), 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(00\)80085-4](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(00)80085-4)
- Pomeranz, Y., & Shands, H. L. (1974). Food uses of barley. *C R C Critical Reviews in Food Technology*, 4(3), 377–394. <https://doi.org/10.1080/10408397409527162>

- Ponomarova, O., Gabrielli, N., Sévin, D. C., Mülleder, M., Zirngibl, K., Bulyha, K., Andrejev, S., Kafkia, E., Typas, A., Sauer, U., Ralser, M., & Patil, K. R. (2017). Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Systems*, 5(4), 345-357.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2017.09.002>
- Popova-Krumova, P., Danova, S., Atanasova, N., & Yankov, D. (2024). Lactic Acid Production by *Lactiplantibacillus plantarum* AC 11S—Kinetics and Modeling. *Microorganisms*, 12(4). <https://doi.org/10.3390/microorganisms12040739>
- Punia Bangar, S., Sharma, N., Bhardwaj, A., & Phimolsiripol, Y. (2022). Lactic acid bacteria: A bio-green preservative against mycotoxins for food safety and shelf-life extension. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 14(2), 13–31. <https://doi.org/10.15586/qas.v14i2.1014>
- Qiu, M., Wang, Y., Sun, L., Deng, Q., & Zhao, J. (2021). Fatty acids and oxylipins as antifungal and anti-mycotoxin agents in food: A review. *Toxins*, 13(12). <https://doi.org/10.3390/TOXINS13120852>
- Rämö, S., Kahala, M., & Joutsjoki, V. (2022). Aflatoxin B1 Binding by Lactic Acid Bacteria in Protein-Rich Plant Material Fermentation. *Applied Sciences*, 12(24), 12769. <https://doi.org/10.3390/app122412769>
- Reddy, L. V., Kim, Y. M., Yun, J. S., Ryu, H. W., & Wee, Y. J. (2016). L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Bioresource Technology*, 209, 187–194. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2016.02.115>
- Romanens, E., Freimüller Leischtfeld, S., Volland, A., Stevens, M. J. A., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L., & Miescher Schwenninger, S. (2019). Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 262–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.001>
- Sabunevica, S., & Zagorska, J. (2023). Organic Milk as Medium for Lactic Acid Bacteria Growth: A Review. *Rural Sustainability Research*, 49(344), 73–86. <https://doi.org/10.2478/plua-2023-0010>
- Sadiq, F. A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H., & Chen, W. (2019). Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(5), 1403–1436. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12481>
- Saeed, A. H., & Salam, A. I. (2013). Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food and Nutrition Sciences*, 4(11A), 73–87. [10.4236/fns.2013.411A010](https://doi.org/10.4236/fns.2013.411A010)

- Saladino, F., Luz, C., Manyes, L., Fernández-Franzón, M., & Meca, G. (2016). In vitro antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control*, 67, 273–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.012>
- Salazar, Y., Valle, P. A., Rodríguez, E., Soto-Cruz, N. O., Páez-Lerma, J. B., & Reyes-Sánchez, F. J. (2023). Mechanistic Modelling of Biomass Growth, Glucose Consumption and Ethanol Production by *Kluyveromyces marxianus* in Batch Fermentation. *Entropy*, 25(3). <https://doi.org/10.3390/e25030497>
- Schnürer, J., & Magnusson, J. (2005). Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. *Trends in Food Science and Technology*, 16(1–3), 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.02.014>
- Sharma, V., & Mishra, H. N. (2014). Unstructured kinetic modeling of growth and lactic acid production by *Lactobacillus plantarum* NCDC 414 during fermentation of vegetable juices. *LWT*, 59(2P1), 1123–1128. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.05.039>
- Shehata, M. G., Badr, A. N., El Sohaimy, S. A., Asker, D., & Awad, T. S. (2019). Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. *Annals of Agricultural Sciences*, 64(1), 71–78. <https://doi.org/10.1016/j.aoas.2019.05.002>
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. In *Current Opinion in Biotechnology*. 56, 138–146). <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.11.015>
- Simões, L., Fernandes, N., Teixeira, J., Abrunhosa, L., & Dias, D. R. (2023). Brazilian Table Olives: A Source of Lactic Acid Bacteria with Antimycotoxigenic and Antifungal Activity. *Toxins*, 15(1). <https://doi.org/10.3390/toxins15010071>
- Smith, D. F. Q., & Casadevall, A. (2023). Disaster mycology. *Biomedica*, 43, 267–277. <https://doi.org/10.7705/BIOMEDICA.6943>
- Soto-Cruz, O., Favela-Torres, E., & Saucedo-Castañeda, G. (2002). Modeling of growth, lactate consumption, and volatile fatty acid production by *Megasphaera elsdenii* cultivated in minimal and complex media. *Biotechnology Progress*, 18(2), 193–200. <https://doi.org/10.1021/bp010189y>
- Stavropoulou, E., & Bezirtzoglou, E. (2019). Predictive Modeling of Microbial Behavior in Food. *Foods*, 8(12), 654. <https://doi.org/10.3390/foods8120654>
- Stoev, S. D. (2022). New Evidences about the Carcinogenic Effects of Ochratoxin A and Possible Prevention by Target Feed Additives. *Toxins*, 14(6), 380. <https://doi.org/10.3390/toxins14060380>
- Suarez-Ospina, D. (2018). *PhD thesis*. Universidad de América.

- Suárez-Quiroz, M., De Louise, B., Gonzalez-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., & Guiraud, J. P. (2005). The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *International Journal of Food Science and Technology*, 40(6), 605–611. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.00958.x>
- Swami, U., & Gondil, V. S. (2020). Introduction to Food Contamination and Safety. In *Food Contamination and Safety* (pp. 1–24). Delve Publishing.
- Taiwo, O. R., Onyeaka, H., Oladipo, E. K., Oloke, J. K., & Chukwugozie, D. C. (2024). Advancements in Predictive Microbiology: Integrating New Technologies for Efficient Food Safety Models. *International Journal of Microbiology*, 2024, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2024/6612162>
- Teusink, B., & Molenaar, D. (2017). Systems biology of lactic acid bacteria: For food and thought. *Current Opinion in Systems Biology*, 6, 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.coisb.2017.07.005>
- Van der Stegen, G. H. D. (2003). Enhancement of coffee quality by mould prevention. *Food Control*, 14(4), 245–249. [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(03\)00009-4](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(03)00009-4)
- Varsha, K. K., & Nampoothiri, K. M. (2016). Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control*, 69, 61–64. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2016.04.032>
- Venkatesh, N., & Keller, N. P. (2019). Mycotoxins in conversation with bacteria and fungi. *Frontiers in Microbiology*, 10, 403. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00403>
- Vinderola, G., Ouwehand, A. C., Salminen, S., & von Wright, A. (2019). Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. In *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. <https://doi.org/10.1201/9780429057465>
- Viniegra-González, G., Favela-Torres, E., Aguilar, C. N., Romero-Gomez, S. de J., Díaz-Godínez, G., & Augur, C. (2003). Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. *Biochemical Engineering Journal*, 13(2–3), 157–167. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00128-6)
- Wan, J., Chen, B., & Rao, J. (2020). Occurrence and preventive strategies to control mycotoxins in cereal-based food. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(3), 928–953. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12546>
- Wang, L., Hua, X., Shi, J., Jing, N., Ji, T., Lv, B., Liu, L., & Chen, Y. (2022). Ochratoxin A: Occurrence and recent advances in detoxification. *Toxicon*, 210, 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2022.02.010>



- Wang, X., Wang, D., Zhang, S., Zhu, M., Yang, Q., Dong, J., Zhang, Q., & Feng, P. (2023). Research Progress Related to Aflatoxin Contamination and Prevention and Control of Soils. *Toxins*, 15(475), 34–48.
- Wang, X.-L., Sun, Y.-Q., Pan, D.-T., & Xiu, Z.-L. (2024). Kinetics-based development of two-stage continuous fermentation of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum*. *Biotechnol Biofuel*. 17(38). <https://doi.org/10.1186/s13068-024-02486-5>
- Wang, Y., Chan, K.-L., Ali, M., Rahman, A.-, Sonomoto, K., & Leu, S.-Y. (2020). Dynamic simulation of continuous mixed sugar fermentation with increasing cell retention time for lactic acid production using *Enterococcus mundtii* QU 25. *Biotechnology for Biofuels* 2020 13:1, 13(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S13068-020-01752-6>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1–19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Xu, P., & Peng Xu, C. (2020). Analytical solution for a hybrid Logistic-Monod cell growth model in batch and continuous stirred tank reactor culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 117(3), 873–878. <https://doi.org/10.1002/BIT.27230>
- Yang, Y., Li, G., Wu, D., Liu, J., Li, X., Luo, P., Hu, N., Wang, H., & Wu, Y. (2020). Recent advances on toxicity and determination methods of mycotoxins in foodstuffs. *Trends in Food Science and Technology*, 96, 233–252. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.12.021>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O’toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhu, F. (2015). Impact of ultrasound on structure, physicochemical properties, modifications, and applications of starch. In *Trends in Food Science and Technology*. 43(1), 1–17. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.12.008>
- Zolfaghari, H., khezerlou, A., Banihashemi, S. A., Tavassoli, M., & Ehsani, A. (2023). Review on Bio-Detoxification of Aflatoxins Based on Lactic Acid Bacteria: Mechanism and Applications. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 13(1), 1–8. <https://doi.org/10.55251/jmbfs.9424>

Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881.

## 11 ▶ Anexos

### Anexo 1. Desarrollo del acoplamiento del modelo de Gompertz al modelo de Luedeking-Piret.

A continuación, se describe el desarrollo del acoplamiento del modelo de Gompertz al modelo de Luedeking-Piret, usado en la sección 7.6, el cual describe la relación entre el crecimiento microbiano y la formación de productos (en este caso, ácido láctico).

El modelo de Gompertz se propone para modelar el crecimiento celular:

$$\text{Ecuación diferencial: } \frac{dX}{dt} = k X \ln \left[ \frac{X_{max}}{X} \right] \quad (1)$$

$$\text{Solución: } X = X_{max} \exp(-b \exp(-k t)) \quad (2)$$

$$\text{donde cuando } t = 0 \quad X = X_0 = X_{max} \exp(-b) \quad (3)$$

El modelo de Luedeking-Piret describe la formación de producto asociado y no asociado al crecimiento:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4)$$

Integrando, obtenemos:

$$P = P_0 + \alpha (X - X_0) + \beta \int_{t_0}^t X dt \quad (5)$$

La ecuación diferencial de Gompertz (1) nos da:

$$X = \frac{\frac{dX}{dt}}{k \ln \left[ \frac{X_{max}}{X} \right]}$$



Sustituyendo en la integral de la ecuación 5, obtenemos:

$$\int_{t_0}^t X dt = \left[ \frac{1}{k} \right] \int_{X_0}^X \frac{dX}{\ln \left[ \frac{X_{max}}{X} \right]} \quad (6)$$

Realizando un cambio de variable se sustituye:

$$U = \frac{X}{X_{max}}, X = X_{max} U, dX = X_{max} dU$$

en la ecuación 6, obtenemos:

$$\int_{t_0}^t X dt = - \left[ \frac{1}{k} \right] \int_{X_0}^X \frac{dX}{\ln \left[ \frac{X}{X_{max}} \right]} = - \left[ \frac{X_{max}}{k} \right] \int_{U_0}^U \frac{dU}{\ln(U)}$$

$$\int_{t_0}^t X dt = - \left[ \frac{X_{max}}{k} \right] \left( \int_0^U \frac{dU}{\ln(U)} - \int_0^{U_0} \frac{dU}{\ln(U)} \right)$$

$$\int_{t_0}^t X dt = - \left[ \frac{X_{max}}{k} \right] (li(U) - li(U_0)) \quad (7)$$

definiendo la función logaritmo integral como:

$$li(U) = \int_0^U \frac{ds}{\ln(s)} \quad (8)$$

El logaritmo integral se calcula con herramientas como Mathematica, Matlab o Maxima. En nuestro caso empleamos el software gratuito Maxima (<https://maxima.sourceforge.io>) con la mayor precisión posible. Así resulta:

$$\int_{t_0}^t X dt = - \left[ \frac{X_{max}}{k} \right] \left( li \left( \frac{X}{X_{max}} \right) - li \left( \frac{X_0}{X_{max}} \right) \right)$$

$$\int_{t_0}^t X dt = \left[ \frac{X_{max}}{k} \right] \left( li \left( \frac{X_0}{X_{max}} \right) - li \left( \frac{X}{X_{max}} \right) \right) \quad (9)$$

Aplicando la ecuación 9 en la 5 resulta:

$$P = P_0 + \alpha (X - X_0) + \left[ \frac{\beta X_{max}}{k} \right] \left[ li \left( \frac{X_0}{X_{max}} \right) - li \left( \frac{X}{X_{max}} \right) \right] \quad (10)$$

Para la estimación de los parámetros se recurre a la siguiente metodología:

- 1) Estimar los parámetros de la solución del modelo de Gompertz (2 y 3) con la subrutina Solver contenida en Excel
- 2) Realizar una regresión multilineal de las ecuaciones 10 y 11 con la subrutina de regresión contenida en Excel, que son de la forma general

$$Y = A_0 + A_1 X_1 + A_2 X_2$$

Anexo 2. Curva de calibración para la cuantificación de OTA

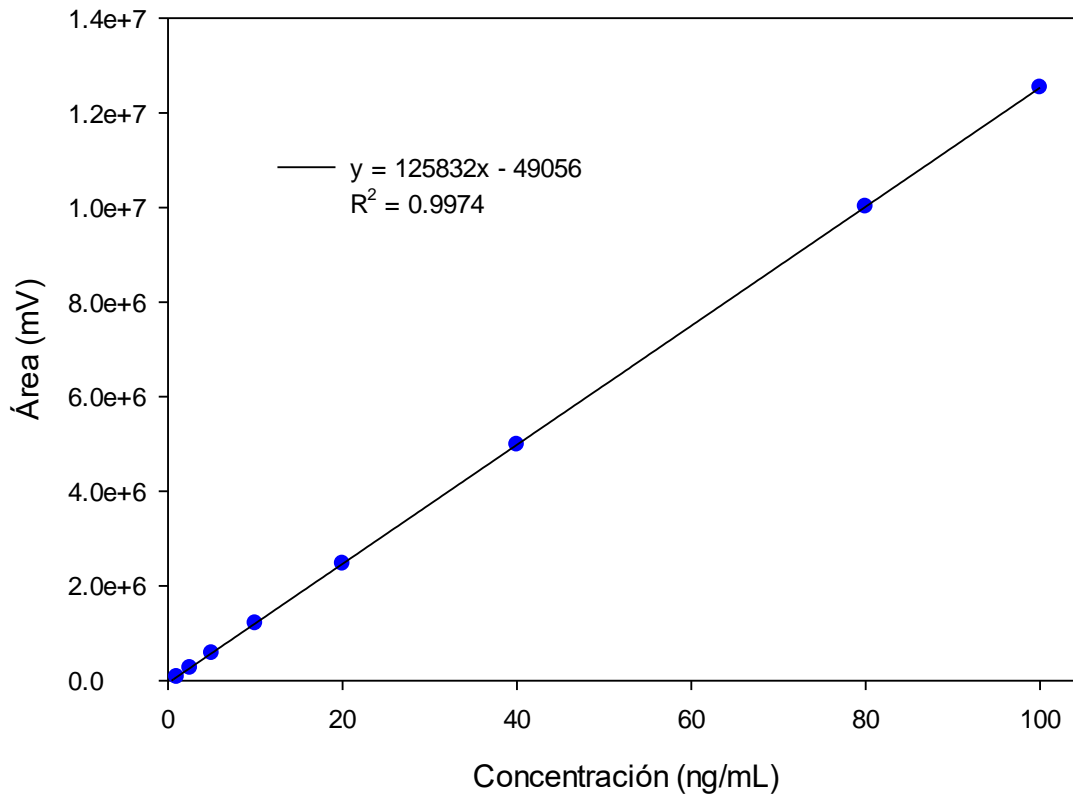


Figura A2.1 - Curva de calibración para la cuantificación de OTA con estándar de OTA

### Anexo 3. Productos científicos obtenidos de la tesis.

1. Artículo publicado en la revista *International Journal of Food Microbiology*, en Noviembre 2023

International Journal of Food Microbiology 404 (2023) 110320



Inhibition of *Aspergillus carbonarius* growth and Ochratoxin A production using lactic acid bacteria cultivated in an optimized medium

G.A. Domínguez-Gutiérrez<sup>a</sup>, I. Perraud-Gaime<sup>b</sup>, H. Escalona-Buendía<sup>a</sup>, N. Durand<sup>c</sup>, E.I. Champion-Martínez<sup>d</sup>, R.R. Fernández-Soto<sup>a</sup>, G. Saucedo-Castañeda<sup>a</sup>, G. Rodríguez-Serrano<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Biotechnology, Metropolitan Autonomous University, ZC, 09310, Iztapalapa, Mexico City, Mexico

<sup>b</sup> Aix Marseille Université, Avignon Université, CNRS, IRD, IMBE, Marseille, France

<sup>c</sup> UMR Qualisud, CIRAD, Montpellier SupAgro, Univ. d'Avignon, Univ. de La Reunion, Univ. Montpellier, 34398 Montpellier, France

<sup>d</sup> Department of Food Processes, Technological University of the Center of Veracruz, Cuitlahuac, 94910 Veracruz, Mexico

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110320>

Received 22 February 2023; Received in revised form 6 July 2023; Accepted 10 July 2023

Available online 18 July 2023

0168-1605/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.



## 2. Participaciones en congresos

Congreso e-Latin Food, 2020



Congreso Internacional de Biociencias, 2021

La maestría en Biociencias de la Universidad

Autónoma de Guerrero



Otorga la presente **CONSTANCIA** a los autores:

**Domínguez-Gutiérrez, G.A., Gaimé-Perraud, I., Saucedo-Castañeda, G.,  
Rodríguez-Serrano, G. M.**

Del trabajo que lleva por título: *Diseño de un medio de cultivo de bajo costo para el crecimiento de bacterias ácido lácticas empleadas como potencial agente de control biológico de la producción de Ocratoxina A*



Por la **PRESENTACIÓN ORAL** en las mesas de trabajo

En el **III Congreso Internacional de Biociencias**

Realizado de forma virtual del 13 al 15 de octubre de 2021

Dr. Arturo Benítez Peralta

Presidente del comité organizador del  
III Congreso Internacional de Biociencias

Dra. Verónica Irazú Martínez Santos

Comité organizador del III Congreso  
Internacional de Biociencias

## Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 2023



### LA SOCIEDAD MEXICANA DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

#### EXTIENDE LA CONSTANCIA A:

Domínguez-Gutiérrez, G.A., Perraud-Gaime, I., Escalona-Buendía H., Durand, N., Champion Martínez E.I.,  
Fernández-Soto, R.R., Saucedo-Castañeda, G., Rodríguez-Serrano, G.

#### Por su participación en la sesión de carteles con el trabajo:

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE ASPERGILLUS CARBONARIUS Y LA PRODUCCIÓN DE  
OCRATOXINA A USANDO BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS CULTIVADAS EN UN MEDIO OPTIMIZADO

Ixtapa Zihuatanejo, Gro, a 11 - 15 de septiembre del 2023



\_\_\_\_\_  
DRA. ROMINA RODRÍGUEZ SANOJA  
PRESIDENTA MDN 2022-2024



\_\_\_\_\_  
DR. LUIS FLORES COTERA  
PRESIDENTE DEL CONGRESO



\_\_\_\_\_  
DRA. BEATRIZ RUIZ VILLAFÁN  
SECRETARIA MDN 2022-2024





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00290

Matrícula: 2173805717

Evaluación de la capacidad inhibitoria y de detoxificación de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* y la producción de ocratoxina A

En la Ciudad de México, se presentaron a las 9:00 horas del día 28 del mes de noviembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA  
DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA BUENDIA  
DRA. GLORIA DIAZ RUIZ  
DR. SERGIO ANDRES ALATORRE SANTAMARIA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: GLORIA ANGELICA DOMINGUEZ GUTIERREZ

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

**APROBAR**

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



GLORIA ANGELICA DOMINGUEZ GUTIERREZ

ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALVA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO  
CASTAÑEDA

VOCAL

DR. HECTOR BERNARDO ESCALONA  
BUENDIA

VOCAL

DRA. GLORIA DIAZ RUIZ

SECRETARIO

DR. SERGIO ANDRES ALATORRE  
SANTAMARIA