



Casa abierta al tiempo

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

**“Identificación de Bacterias Lácticas
Termotolerantes Aislada de Productos Cárnicos
Cocidos Para Ser Utilizadas Como Probióticos”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

P R E S E N T A :

M en Biotec. NORMA LETICIA RAMÍREZ CHAVARÍN

“El Posgrado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa está incluido en el patrón de Posgrado de excelencia del CONACYT, y además cuenta con el apoyo del mismo consejo con el convenio 471-O/ doctorado en Biotecnología”

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la
unidad Iztapalapa aprobó la comunicación de resultados

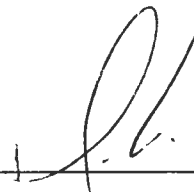
**"Identificación de Bacterias Lácticas
Termotolerantes Aislada de Productos Cárnicos
Cocidos Para Ser Utilizadas Como Probióticos"**

Que presentó

M en Biotec. Norma Leticia Ramírez Chavarín

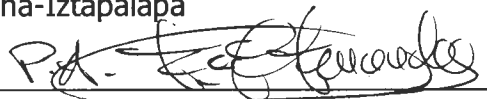
El día **13** de **Mayo** del 2009

Directora: Dra. María Lourdes Pérez Chabela



Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesor: Dr. José Mariano García Garibay



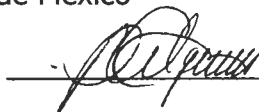
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesora: Dra. Carmen Wachter Rodarte



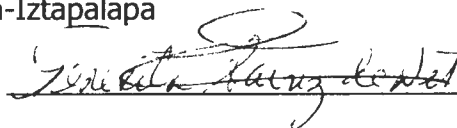
Universidad Nacional Autónoma de México

Sinodal: Dra. Edith Ponce Alquicira



Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Sinodal: Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes



Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

Un agradecimiento especial para la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

Agradecimientos

A todos y cada uno de mis asesores, por regalarme su valioso tiempo, por brindarme apoyo, por ayudarme a resolver mis dudas y sobre todo por la calidad humana que recibí de ellos.

En especial quiero darle mi más gran agradecimiento a la **Dra. Ma. Lourdes Pérez Chabela**, por brindarme la oportunidad de trabajar y aprender de ella. Gracias por haber estado siempre pendiente de mí, por haber dedicado el tiempo necesario y más, para resolver mis dudas en todo momento y a toda hora y por la enorme comprensión que tuvo en el momento que se me presentaba algún problema. Pero sobre todo, gracias **LULU** por tu amistad.

A la **Dra. Carmen Wachter Rodarte**, por ser la gran persona que es y por la disponibilidad que presentaba para la realización de este trabajo, también, por apoyo de presentarme con gente que me ayudo a la realización de algunas técnicas para este trabajo, por el apoyo para la revisión rápida de este manuscrito y por ayudarme a aclarar mis dudas.

Al **Dr. Carlos Eslava** de la Facultad de Medicina y a todo su equipo de trabajo, José, Lulu y Ulises, que me ayudo incondicionalmente en este trabajo para su conclusión y sobre todo por la enorme calidad humana con que me trataba.

A la **Dra. Edith Ponce Alquícira**, por la ayuda recibida en la revisión de este trabajo, y por ayudarme a resolver mis dudas.

A la **Dra. Teresita Sainz** por haber aceptado con gusto ser parte de mi examen y por ayudarme a la revisión de este trabajo.

Al **Dr. Alfonso Totosaús Sánchez**, por haberme asesorado y apoyado en la parte en la revisión del artículo de este trabajo y por sus valiosas sugerencias para mejorar la calidad del trabajo, pero sobre todo por la enorme disponibilidad de atender a mis dudas.

AGRADECIMIENTOS

Al **Dr. Francisco José Fernández Perrino**, por haberme asesorado en algunas ocasiones y apoyado en su laboratorio, para realizar algunas cosas de la parte experimental y sobre todo por apoyarme como coordinador de posgrado.

A mis amigas, **Sandra, Angelica, Celia, Irma y Ana M.** que en su momento me apoyaron cuando más las necesitaba y por supuesto por la gran amistad que me brindaron.

A mi esposo **Jorge Armando Haro castellanos** y a mi hija **Yarit Samantha Haro Ramírez**, quienes son mi razón de vivir y de superarme. Gracias por ser parte de mí, por existir y compartir todo momento conmigo. Por apoyarme en todas las circunstancias y no abandonarme. Gracias por el amor incondicional que espero permanezca siempre, pero sobre todo gran lección que has aportado a mi vida.

A mi **MADRE** gracias por darme la vida y apoyarme en todo sin cuestionarme, por brindarme toda su comprensión, confianza y apoyo incondicional en todo momento y en todo lugar. Gracias por ser una gran madre y padre a la vez. Muchas gracias, **TE AMO.**

A mis hermanos, tíos, sobrinos y sobre todo a **mamá Margarita y MARY** por todos los momentos que hemos vivido y disfrutado juntos, y por todas las cosas valiosas que cada uno de ustedes han aportado a mi vida.

A mi **Suegra LOLITA**, cuñados y sobrinos, por su comprensión y confianza incondicional, pero sobre todo por el cariño y la admiración que me tienen. Especialmente a **LOLIS Y ANITA** por preocuparse por mí y mi trabajo gracias por ser mis amigas las quiero mucho.

Agradezco a **DIOS** por darme la oportunidad para que llegara este momento y sobre todo por darme vida para seguir adelante.

GRACIAS A TODOS

1	RESUMEN	1
2	ABSTRACT	3
3	INTRODUCCIÓN	5
4	OBJETIVO GENERAL	7
4.1	Objetivos Específicos	7
5	HIPÓTESIS	7
6	BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)	8
6.1	Características Generales	8
6.2	Producción de Metabolitos	8
6.2.1	Ácidos Orgánicos	11
6.2.2	Bacteriocinas	11
6.2.3	Diacetilo	13
6.2.4	Peróxido de hidrógeno	14
6.2.5	Reuterina	14
7	IDENTIFICACIÓN	15
7.1	Clasificación de Bacterias Lácticas	15
7.2	Métodos de Identificación	20
7.2.1	Pruebas bioquímicas y Sistema API	20
7.2.2	Métodos moleculares	22
8	TERMOTOLERANCIA	25

8.1	Proteínas del Choque Térmico	26
8.1.1	Mecanismo de Acción de las Hsp	29
8.2	Valor <i>D</i>	30
8.3	Bacterias Lácticas Termotolerantes y su Uso en Productos Cárnicos	32
9	PROBIÓTICOS	35
9.1	Definición	35
9.2	Características	36
9.3	Mecanismo de acción de bacterias probióticas	38
9.4	Evaluación de las Bacterias Lácticas Como Probióticos	39
10	OBJETIVO	43
11	PROLEGÓMENO	43
12	METODOLOGÍA	46
12.1	Aislamiento de Bacterias Lácticas	46
12.2	Identificación Bioquímica	46
12.3	Capacidad Termotolerante	47
12.4	Determinación del Valor <i>D</i>	48
12.5	Identificación Fenotípica	49
12.6	Identificación Genotípica	49
12.6.1	Extracción de ADN	49

12.6.2 Amplificación mediante PCR	51
12.6.3 Identificación por comparación de la secuenciación del gen ARNr 16S	52
13 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
13.1 Propiedades Bioquímicas y Termotolerantes	53
13.2 Valor <i>D</i>	54
13.3 Identificación Fenotípica y Genotípica de Bacterias Lácticas Termotolerantes	57
14 CONCLUSIONES	61
15 OBJETIVO	62
16 PROLEGÓMENO	62
17 METODOLOGÍA	64
17.1 Metodología General	64
17.1.1 Actividad Antagónica	64
17.1.1.1 Preparación de la cepa sensible	64
17.1.1.2 Preparación de la cepa productora	65
17.1.1.3 Actividad antagónica	66
17.2 Determinación de Ácidos Orgánicos	67
17.2.1 Acidez Total Titulable (ATT) (Producción de ácido láctico)	67
17.2.1.1 Inoculación de carne de cerdo	67
17.2.1.2 Preparación de la muestra	67
17.2.2 Cuantificación de ácido acético (Cromatografía de Gases)	68

17.2.2.1	Inoculación de la carne de cerdo	68
17.2.2.2	Preparación de la muestra	69
17.2.2.3	Condiciones de cromatografía	69
18	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
18.1	Actividad Antagónica	71
18.2	Determinación de Ácidos Orgánicos (láctico y acético)	76
18.2.1	Producción de ácido láctico	76
18.2.2	Cuantificación de ácido acético por cromatografía de gases	83
19	CONCLUSIONES	86
20	OBJETIVO	87
21	PROLEGÓMENO	87
22	METODOLOGÍA	89
22.1	Tolerancia a pH Ácido	89
22.2	Sobrevivencia a Jugo Gástrico Simulado	90
22.3	Tolerancia a Ácido Taurocólico y Bilis	91
22.4	Coagregación	92
22.5	Autoagregación	93
22.6	Ensayo de Adherencia a Células HEp-2	94
22.6.1	Día 1 Obtención de la suspensión bacteriana	94
22.6.2	Día 2 Preparación de la placa de propileno de 24 pozos	95

22.6.3 Día 3 Ensayo de Adherencia.	95
23 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	97
23.1 Tolerancia a pH Ácidos	97
23.2 Sobrevivencia a Jugo Gástrico Simulado	100
23.3 Tolerancia a Bilis	102
23.4 Tolerancia a Ácido Taurocólico	104
23.5 Coagregación	107
23.6 Autoagregación	110
23.7 Ensayo de Adherencia a Células HEp-2	113
24 CONCLUSIONES	124
25 CONCLUSIONES GENERALES	125
26 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO	128
27 BIBLIOGRAFÍA	129

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1</i> Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular (Helander y col., 1997).	10
<i>Tabla 2</i> Clasificación de bacteriocinas (Cotter y col., 2005)	13
<i>Tabla 3</i> Géneros de bacterias lácticas según Orla-Jensen. Citado por Stiles y Holzapfel (1997).	16
<i>Tabla 4</i> Géneros reconocidos de bacterias lácticas desde 1995 (Lucke, 1996).	18
<i>Tabla 5</i> Clases de proteínas del choque térmico (Hsp) (Coronado y col., 1999)	28
<i>Tabla 6</i> Microorganismos usados como probióticos (Macfarlane y Cummings, 1999; Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001;)	37
<i>Tabla 7</i> Cebadores para PCR utilizados en este estudio	52
<i>Tabla 8</i> Resistencia al calor de las cepas de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos	54
<i>Tabla 9</i> Crecimiento después del tratamiento térmico y valor-D para BAL aisladas de productos cárnicos cocidos	55
<i>Tabla 10</i> Identificación de BAL termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos con sistema API 50 CH y comparación secuencias del gen ARNr 16S.	58
<i>Tabla 11</i> Condiciones cromatográficas para el análisis de ácido acético	70
<i>Tabla 12</i> Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre microorganismos deteriorantes.	72
<i>Tabla 13</i> Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre ellas mismas.	73
<i>Tabla 14</i> Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre microorganismos patógenos.	74
<i>Tabla 15</i> Producción de ácido acético por las bacterias lácticas termotolerantes en un sistema de carne de cerdo almacenado 1 y 8 días a 4 °C.	84

<i>Tabla 16 Tolerancia a pH bajos de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.</i>	98
<i>Tabla 17 Tolerancia a bilis de bacterias lácticas termotolerantes</i>	103
<i>Tabla 18 Capacidad de coagregación de las bacterias lácticas termotolerantes con E. coli O139:H26 y Salmonella parera IV O11:Z4Z23</i>	109
<i>Tabla 19 Capacidad de autoagregación de las bacterias lácticas termotolerantes durante 2 y 24 h de incubación.</i>	112

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1 Esquema del árbol filogenético sin raíces de las bacterias lácticas, basado en secuenciación del gen 16S ARNr (Axelsson, 2004).</i>	19
<i>Figura 2 (A) Curva de supervivencia y (B) Curva del tiempo de destrucción térmica (Silla, 1992).</i>	31
<i>Figura 3 Producción de ácido láctico por Pediococcus pentosaceus (11) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	77
<i>Figura 4 Producción de ácido láctico por Pediococcus pentosaceus (12) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	78
<i>Figura 5 Producción de ácido láctico por Pediococcus pentosaceus (15L) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	78
<i>Figura 6 Producción de ácido láctico por Aerococcus viridans (21) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	79
<i>Figura 7 Producción de ácido láctico por Pediococcus pentosaceus (22) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	79
<i>Figura 8 Producción de ácido láctico por Enterococcus faecium (10a) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	80
<i>Figura 9 Producción de ácido láctico por Pediococcus pentosaceus (15a) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	80

<i>Figura 10 Producción de ácido láctico por Lactobacillus plantarum (15c) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	81
<i>Figura 11 Producción de ácido láctico por Lactobacillus plantarum (17) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	81
<i>Figura 12 Producción de ácido láctico por Enterococcus faecium (18) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.</i>	82
<i>Figura 13 Supervivencia al jugo gástrico simulado a pH 2.0 de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.</i>	101
<i>Figura 14 Inhibición de las bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos a ácido taurocólico.</i>	106
<i>Figura 15 (A) Control de la adhesión agregativa de E. coli 87125 en células epiteliales HEP-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	116
<i>Figura 16 (A) Adhesión difusa de Pedicoccus pentosaceus (11) en células HEP-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	116
<i>Figura 17 (A) Adhesión parecida a la localizada de Pedicoccus pentosaceus (12) en células HEP-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	117
<i>Figura 18 (A) Adhesión difusa de Pedicoccus pentosaceus (15 L) en células HEP-2 a 100 X. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	117
<i>Figura 19 Adhesión difusa de Aerococcus viridans (21) en células HEP-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	118

<i>Figura 20 (A) Adhesión difusa de <i>Pediococcus pentosaceus</i> (22) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	118
<i>Figura 21 (A) Adhesión difusa de <i>Enterococcus faecium</i> (10a) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de una parte de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	119
<i>Figura 22 (A) Adhesión difusa de <i>Pediococcus pentosaceus</i> (15a) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	119
<i>Figura 23 (A) Adhesión difusa de <i>Lactobacillus plantarum</i> (15c) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	120
<i>Figura 24 (A) Adhesión difusa de <i>Lactobacillus plantarum</i> (17) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	120
<i>Figura 25 (A) Adhesión difusa de <i>Enterococcus faecium</i> (18) en células HEp-2 a 100 x. (B) es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.</i>	121

ÍNDICE DE ECUACIONES

<i>Ecuación 1 Tiempo de reducción decimal (Silla, 1992).</i>	48
<i>Ecuación 2 Porcentaje de ácido láctico</i>	68
<i>Ecuación 3 Coagregación (Handley y col., 1987)</i>	93
<i>Ecuación 4 Autoagregación (Reniero y col., 1992)</i>	94

1 RESUMEN

El objetivo de esta tesis fue identificar bacterias lácticas termotolerantes para ser usadas como probióticos en productos cárnicos cocidos, se identificaron diez cepas de bacterias lácticas termotolerantes utilizando el Sistema API y por medio de una identificación genotípica utilizando el gen 16S ARNr. Se determinó la resistencia térmica obteniendo su valor *D*. Se cuantificó la producción de ácidos orgánicos y se realizó la actividad antagónica contra bacterias deteriorantes, patógenas y entre ellas mismas. Se evaluó el potencial probiótico mediante el crecimiento a valores bajos de pH y en bilis, agregación, coagregación y adherencia a la mucosa intestinal.

La identificación fenotípica no concordó con la genotípica de las diez cepas totalmente, por lo que se decidió quedarse con la identificación genotípica. Las cepas identificadas mediante este método fueron: cinco cepas de *Pediococcus pentosaceus*, dos de *Lactobacillus plantarum*, dos de *Enterococcus faecium* y una de *Aerococcus viridans*, las cuales son cepas nativas de productos cárnicos. En la resistencia térmica, las diez cepas de BAL resistieron 70 °C por 30 min.

Las diez cepas de BAL-T tuvieron actividad antagónica contra *Pseudomonas* a las condiciones sometidas en este estudio y solo dos cepas de BAL-T tuvieron actividad antagónica entre ellas mismas. Las diez cepas tuvieron producción de ácido láctico y una mínima cantidad de ácido acético, con lo cual se afirmó que se trata de bacterias lácticas homofermentativas, debido a que su producto mayoritario es el ácido láctico con un 90 %.

Tres de las diez cepas crecieron a un pH de 1 y las diez lograron desarrollarse bien a valores de pH de 3. La mayoría de las cepas mostraron buenos porcentajes de agregación y coagregación y todas mostraron una buena adherencia en células epiteliales HEP-2.

Las bacterias lácticas identificadas en este estudio, pueden ser aplicadas como probióticos en productos cárnicos cocidos ya que su capacidad termotolerante les permitirá predominar durante y después del procesamiento.

2 ABSTRACT

The aim of this work was to identify thermotolerant lactic acid bacteria and their potential use as probiotics in cooked meat products, identified ten strains of thermotolerant lactic acid bacteria using API System and genotypically identified with the 16S ribosomal RNA gene sequencing analysis to determine the genera and specie. Quantified the production of organic acids (lactic and acetic) and antagonistic activity against deteriorating bacteria, pathogens and among themselves. Probiotic properties, growth at low pH and bile, co-aggregation and aggregation ability, and adhesion to intestinal cells, were tested.

The differences between genera and species among the identified lactic acid bacteria were due to the close phylogenetic proximity. Due this proximity, of the use of the 16S gene is more certain in the bacterial identification. The identified strains were: five strains of *Pediococcus pentosaceus*, two strains of *Lactobacillus plantarum*, two strains of *Enterococcus faecium* and one strain of *Aerococcus viridans*, considered as native strains in meat products. In thermal resistance, the ten strains of lactic acid bacteria resisted 70 °C for 30 minutes. The ten strains LAB-T produced antagonistic activity against *Pseudomonas* under the conditions tested of this study, only two strains presented antagonistic activity between them. The ten strains had production of lactic acid and a minimal amount of acetic acid, since they were homofermentatives because their majority is the products lactic acid with 90 %. As probiotics, three strains could grow at a pH of 1.0 and all were

able to growth at pH 3.0. Most strains showed good aggregation and co-aggregation ability and all showed strong adhesion to HEp-2 epithelial cells.

As conclusion, lactic bacteria identified in this study can be employed as starter probiotic cultures in cooked meat products since their thermotolerant capacity allow them to become the dominant flora after and during processing, besides their probiotic properties.

3 INTRODUCCIÓN

Las bacterias lácticas (BAL) son un grupo muy diverso que comprende 11 géneros (*Carnobacterium*, *Entereococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*), Gram positivas, catalasa negativa y crecen en condiciones microaerófilas o estrictamente anaerobias y no forman esporas. Una de sus características principales es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Estas características fenotípicas han sido frecuentemente usadas para la clasificación de estas bacterias, incluyendo una variedad de pruebas fisiológicas y bioquímicas.

Algunas especies bacterianas no pueden, con los métodos tradicionales, diferenciarse de especies muy cercanas. Para estas especies existen métodos moleculares que resultan los más convenientes, los cuales pueden ser complementados por identificación bioquímica.

Las bacterias lácticas son consideradas generalmente organismos “de grado alimentario” y muestran un comportamiento dentro de los sistemas alimentarios que les permite ser seleccionadas como cultivos bioprotectores debido a que producen sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas, diacetilo, etc., inhibiendo el desarrollo de microorganismos alterantes y patógenos y proporcionando además modificación en algunas propiedades sensoriales. Sin embargo, existen algunas bacterias lácticas (BAL-T) que producen las llamadas

proteínas de choque térmico que les permite sobrevivir a temperaturas más altas que su temperatura óptima haciéndolas más importantes para la aplicación en la industria alimentaria.

Durante los últimos años, se han investigado el uso de probióticos. Un probiótico es un complemento alimenticio a base de microorganismos vivos que produce efecto benéfico sobre el organismo animal, mejorando el equilibrio microbiano intestinal. Se han propuesto dos posibles mecanismos que producen efectos benéficos de las bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal, estos son: la producción de sustancias antimicrobianas tales como ácido láctico y bacteriocinas, y la adherencia y co-agregación a la mucosa intestinal para formar una barrera que impide la colonización por patógenos.

Para una mejor comprensión de este trabajo, se dividió en 5 capítulos; en el primer capítulo se muestran los antecedentes generales del trabajo, los capítulos 2, 3 y 4 abarcan el trabajo experimental, cada capítulo cuenta con un breve prolegómeno del tema, la metodología, los resultados y la discusión de éstos, y la bibliografía utilizada se encuentra en las últimas páginas de la tesis, en el capítulo 5 se resumen las conclusiones generales de este estudio.

4 OBJETIVO GENERAL

Identificar bacterias lácticas termotolerantes previamente aisladas de productos cárnicos cocidos para poder ser utilizadas como probióticos.

4.1 Objetivos Específicos

- Identificar fenotípica y genotípicamente bacterias lácticas previamente aisladas de productos cárnicos cocidos.
- Evaluar la resistencia térmica mediante la determinación del valor D de las bacterias lácticas termotolerantes identificadas previamente.
- Conocer la producción de los metabolitos principales de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.
- Evaluar algunas características para uso como probiótico de bacterias lácticas termotolerantes en productos cárnicos cocidos.

5 HIPÓTESIS

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente, se espera encontrar bacterias lácticas termotolerantes, que además tengan un efecto probiótico (que se adhiera a la pared intestinal, que pueda colonizar dentro de esta y que no sea patógena), para que puedan ser usadas en embutidos cocidos.

CAPITULO I: ANTECEDENTES

6 BACTERIAS LÁCTICAS (BAL)

6.1 Características Generales

Las bacterias lácticas comprenden un gran número de microorganismos Gram positivos, cuya característica principal es la producción de ácido láctico a partir de carbohidratos. Las bacterias lácticas son microaerófilas o anaerobias facultativas y no formadoras de esporas, generalmente son inmóviles, catalasa negativa, no reductoras de nitritos, tolerantes a la presencia de CO₂, nitritos y pueden crecer a valores de pH bajos, algunas bacterias lácticas toleran concentraciones relativamente altas de NaCl (Fragoso y Fernández, 1999).

6.2 Producción de Metabolitos

El crecimiento activo de las BAL en los alimentos en los que se lleva a cabo una fermentación, asociado con el metabolismo de determinados componentes en los mismos, es en parte el responsable de la producción de gran variedad de productos fermentados. Además, estos microorganismos actúan inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas y deteriorantes dando lugar a productos estables y relativamente seguros. La estabilidad de estos productos se atribuye a la conversión de azúcares en ácidos orgánicos, dicha conversión se identifica como la principal responsable de su acción antimicrobiana debido al efecto combinado

del descenso de pH y al consumo de carbohidratos. La producción de agentes antimicrobianos depende de la composición del medio, el pH, la temperatura, el potencial redox, la presencia de microorganismos que compitan con las BAL y el efecto de aditivos (Helander y col., 1997). Sin embargo, se reconoce que estas bacterias son capaces de producir una amplia variedad de sustancias antimicrobianas de bajo peso molecular que incluyen: ácidos orgánicos, bacteriocinas, diacetilo, peróxido de hidrógeno y reuterina (Nitisinprasert y col., 2000). Cada uno de los compuestos tienen características bioquímicas que determinan su mecanismo de inhibición microbiana y el espectro de inhibición sobre los microorganismos que actuarán. En la Tabla 1 se muestra las sustancias antimicrobianas, sus mecanismos de inhibición y los microorganismos sensibles.

Tabla 1 Compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular (Helander y col., 1997).

Compuestos	Microorganismos productores	Microorganismos sensibles
Ácido láctico	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
Ácido acético	Bacterias lácticas Heterofermentativas	Todos los microorganismos; dependientes del pH
Alcoholes	Levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas	Todos los microorganismos
CO ₂	Bacterias lácticas heterofermentativas	La mayoría de los microorganismos
Diacetilo	<i>Lactococcus sp.</i>	Levaduras, bacterias Gram (-) a concentraciones ≥ 200 ppm, bacterias Gram (+) a concentraciones ≥ 300 ppm
Peróxido de Hidrógeno	Todas las bacterias lácticas	Todos los microorganismos
Reuterina	<i>Lactobacillus reuteri</i>	Amplio espectro: bacterias Gram (+), bacterias Gram (-) y hongos
Sidosporas	Algunas bacterias anaerobias facultativas, la mayoría de las aerobias, incluyendo <i>Pseudomonas</i> <i>sp.</i> y <i>Staphylococcus sp.</i>	Microorganismos dependientes de las moléculas de hierro
Ac. benzóico; Ác. mevalónico; Lactona; Metilhidantoina	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Pantoea agglomerans</i> (bacteria Gram (-), <i>Fusarium avenaceum</i>)
Microgard (Rodhín)	<i>Propionibacterium shermanii</i>	La mayor parte de las bacterias Gram (-), levaduras, hongos
Bioprofit (Valio, Helsinki, Finlandia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Propionibacterium freudenreichii</i> <i>ssp. Shermanii</i>	Amplio espectro: hongos, levaduras, bacterias lácticas heterofermentativas, <i>Bacillus sp.</i> , bacterias Gram (+)

6.2.1 Ácidos Orgánicos

La reducción de pH es el principal mecanismo del antagonismo microbiano, las bacterias lácticas fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante ese proceso se obtienen ácidos orgánicos principalmente ácido láctico y acético. Los ácidos orgánicos contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos deteriorantes (Requena y Peláez, 1995).

6.2.2 Bacteriocinas

La producción de bacteriocinas por bacterias lácticas es un factor importante en la acción inhibitoria de estos microorganismos. Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana contra especies microbianas relacionadas taxonómicamente. Algunas bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas presentan una serie de características comunes, como la sensibilidad a la acción de enzimas proteolíticas y la tolerancia a temperaturas elevadas y a valores de pH bajos (Klaenhmmer, 1988).

Durante los últimos años se han identificado un gran número de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas. Las bacteriocinas se clasifican con base a su espectro de actividad, estructura, modo de acción y presencia de receptores sobre la superficie de la célula para la adhesión. La siguiente clasificación está basada en su estructura (Cintas y col., 2001):

- a) Lanbióticos (clase I)
- b) No lanbióticos de pequeña masa molecular ($< 10\text{kDa}$), termoestables y no modificados postraduccionalmente (clase II), entre los que incluyen bacteriocinas del tipo pediocina, muy activas frente a *Listeria spp* (subclase II a), los sistemas de dos péptidos (subclase II b) y las bacteriocinas *sec*-dependientes (subclase II c)
- c) No lanbióticos de elevado masa molecular ($>30\text{ kDa}$) y termolábiles (clase III)

Sin embargo, Cotter y col. (2005) sugirieron una modificación a esta clasificación en donde quedan agrupadas las bacteriocinas en dos grupos mayoritarios: los lanbióticos que contienen lantionina (clase I) y los que no contienen lantionina (clase II), mientras que las bacteriocinas de alto peso molecular y termolabiles (clase III) quedan agrupadas bajo la designación de bacteriolisinas. Con respecto a la antigua clase IV, los autores no la incluyen dentro de esta clasificación debido a que ninguno de los miembros de este grupo sido suficientemente caracterizado como para demostrar su existencia (Tabla 2).

Tabla 2 Clasificación de bacteriocinas (Cotter y col., 2005)

Clase	Subclase	Características	Descripción	Ejemplos
Clase I		Bacteriocinas con lantionina	Lanbióticos de uno y dos péptidos	Péptido sencillo: nisina, mersacidina, lacticina 481
				Péptido doble: lacticina 3147, citolisina.
II	II a	Bacteriocinas sin lantionina, pequeños péptidos heterogéneos	Bacteriocinas tipo pediocina	Pediocina PA1, leucocina A.
	II b		Bacteriocinas de dos péptidos	Lactacina F
	II c		Bacteriocinas cíclicas	Enterocina AS48, reuterina 6.
	II d		Bacteriocinas de un solo péptido y lineales	Lactococina A, divergicina A
Bacteriolisina		Proteínas líticas, no bacteriocinas	Son grandes proteínas termolabiles	Lisostafina, enterolisina A

6.2.3 Diacetilo

El diacetilo es un compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato. Posee un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones y su acción es mayor frente a microorganismos Gram negativos, levaduras y mohos. Aunque el diacetilo se considera como sustancia GRAS (generalmente reconocido como seguro) su utilidad es reducida debido a que se requieren cantidades demasiado

elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio y a que posee un aroma intenso (Requena y Peláez, 1995).

6.2.4 Peróxido de hidrógeno

Las bacterias lácticas producen peróxido de hidrógeno, el cual tiene efecto bactericida pero es altamente oxidante, provocando la peroxidación de los lípidos de la membrana celular y la destrucción de la estructura básica de proteínas celulares (Dahly y col., 1989). La producción de este compuesto por las bacterias lácticas puede ser evitada por incubación anaerobia o por suplementación del medio con catalasa (Rodríguez y col., 1997). La formación de peróxidos puede tener consecuencias indeseables en productos cárnicos donde puede producirse una coloración verdosa, esto se debe a que los peróxidos son fuerte agente oxidante que degrada los pigmentos de la carne. Las enzimas catalasas fraccionan la molécula de peróxido en agua y oxígeno (Fragoso y Fernández, 1999).

6.2.5 Reuterina

Producto de bajo peso molecular, altamente soluble, producido por una especie heterofermentativa (*Lactobacillus reuteri*), este metabolito muestra amplio espectro antimicrobiano, siendo activo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), levaduras, hongos y protozoos. Se ha propuesto a la reuterina para aplicarse en la conservación de alimentos (Helander y col., 1997).

7 IDENTIFICACIÓN

7.1 Clasificación de Bacterias Lácticas

En 1901, Beijernick separó a los coliformes de las bacterias lácticas, por medio de de enriquecimiento de cultivos; a través de estas técnicas, él y otros investigadores pudieron descubrir mas fácilmente el papel de los microorganismos en procesos naturales e industriales. En 1919, Orla-Jensen, clasificó las bacterias ácido-lácticas (BAL) en dos grupos según sus características bioquímicas: las homofermentativas (el ácido láctico como producto mayoritario) y las heterofermentativas (producen otros productos; principalmente etanol y CO₂). Las BAL comprenden alrededor de 11 géneros de los cuales *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* son considerados los principales asociados con los alimentos (Stiles y Holzapfel, 1997; Leisner, 2000; Lyhs y col., 2002; Axelsson, 2004).

El género *Lactobacillus* ha sido usado históricamente de forma segura, especialmente en la industria láctea y juega un papel principal en la producción de leches fermentadas (Maragkoudakis y col., 2006) En la Tabla 3 se muestran los principales géneros de bacterias lácticas utilizadas en alimentos.

Tabla 3 Géneros de bacterias lácticas según Orla-Jensen. Citado por Stiles y Holzapfel (1997).

Géneros (Según Orla – Jensen) 1919	Forma	Catalasa	Reducción de nitratos	Fermentación	Géneros (Según Stiles y Holzapfel) 1997
<i>Betabacterium</i>	Bastón	-	-	Hetero-	<i>Lactobacillus</i> y <i>Weisella</i>
<i>Thermobacterium</i>	Bastón	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i>
<i>Streptobacterium</i>	Bastón	-	-	Homo-	<i>Lactobacillus</i> y <i>Carnobacterium</i>
<i>Streptococcus</i>	Cocos	-	-	Homo-	<i>Streptococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Vagococcus</i>
<i>Betacoccus</i>	Cocos	-	-	Hetero-	<i>Leuconostoc</i> <i>Oenococcus</i> <i>Weisella</i>
<i>Microbacterium</i>	Bastón	+	+	Homo-	<i>Brochothrix</i>
<i>Tetracoccus</i>	Cocos	+ ^b	+	Homo	<i>Pediococcus</i> <i>Tetragenococcus</i>

b= En general, los *Pediococcus* son catalasa negativos, pero algunas cepas producen una pseudocatalasa que da reacciones falsas-positivas.

La primera clasificación sistemática de los *Streptococcus* fue propuesta por Sherman en 1937, quien empleó características serológicas, morfológicas y fisiológicas para diferenciarlos. Los acercamientos más recientes en la taxonomía bacteriana comenzaron basándose en estas características. Posteriormente se amplió al incluir la composición de la pared celular, ácidos grasos celulares,

quinonas y algunas otras características de las células. Durante los 80s el género *Streptococcus* se separó en tres géneros independientes, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Oenococcus* (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las características celulares se han vuelto herramientas importantes para la identificación de bacterias lácticas, tales como son el contenido de Guanina + Citosina del ADN, propiedades electroforéticas de los productos de los genes, estudios de hibridación del ADN-ADN y estructuras y secuencia del ARN ribosomal. Esto ha resultado en cambios dramáticos en la taxonomía de las bacterias lácticas. La clasificación aún permanece indefinida y es el centro de numerosos estudios taxonómicos que involucran ahora características filogenéticas y fenotipos de las bacterias lácticas (Stiles y Holzapfel, 1997). Los géneros reconocidos de bacterias lácticas desde mediados de 1995 se enlistan en el Tabla 4 y la Figura 1 presenta el árbol filogenético de bacterias lácticas.

Tabla 4 Géneros reconocidos de bacterias lácticas desde 1995 (Lucke, 1996).

Género	Fermentaciones en alimentos	Concerniente a : Deterioro alimenticio	Enfermedades causadas por alimentos ¹
<i>Carnobacterium</i>	-	+	-
<i>Enterococcus</i>	-	+	Improbable
<i>Lactobacillus</i>	++	++	-
<i>Lactococcus</i>	++	-	-
<i>Leuconostoc</i>	+	++	-
<i>Oenococcus</i>	+	(+)	-
<i>Pediococcus</i>	+	+	-
<i>Streptococcus</i>	+	-	+
<i>Tetragenococcus</i>	+	(+)	-
<i>Weissella</i>	-	+	-
<i>Aerococcus</i>	-	-	-
<i>Atopobium</i>	-	-	-
<i>Dolodigranum</i>	-	-	-
<i>Gemella</i>	-	-	-
<i>Vagococcus</i>	-	-	-

¹Algunas cepas pueden causar problemas por formación de aminas biogénicas provenientes de aminoácidos.

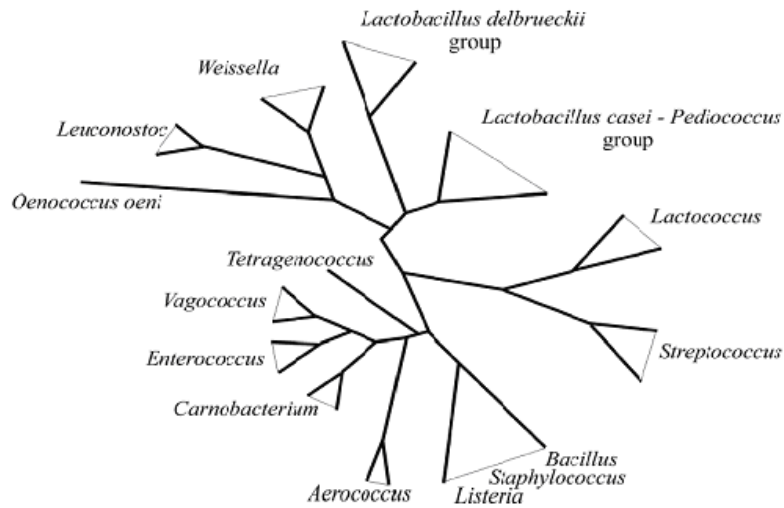


Figura 1 Esquema del árbol filogenético sin raíces de las bacterias lácticas, basado en secuenciación del gen 16S ARNr (Axelsson, 2004).

La clasificación de las bacterias lácticas dentro de diferentes géneros está basado en la morfología, en la manera de fermentar glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido y la habilidad de crecer a altas concentraciones de sal o alcalinidad (Axelsson, 2004).

7.2 Métodos de Identificación

7.2.1 Pruebas bioquímicas y Sistema API

Las características fenotípicas (que incluyen morfología celular, patrón de proteínas y una variedad de pruebas fisiológicas y bioquímicas) han sido frecuentemente utilizadas para la clasificación bacteriana (Klein y col., 1998), dentro de los cuales se encuentra el sistema API 50 CHL, destinado a la identificación del género *Lactobacillus* y microorganismos próximos. Este sistema permite estudiar la fermentación de 49 carbohidratos y un testigo.

Dalezios y Siebert (2001) utilizaron el sistema API para la identificación de BAL reportando que la repetibilidad de las pruebas del API parece ser buena teniendo un 83 % de similitud entre réplicas.

Leisner y col. (2001) aislaron 64 cepas de bacterias lácticas de Tempoyak (es un codimento fermentado tradicional de Malasia hecho de la pulpa de durian) las cuales se identificaron mediante pruebas bioquímicas y utilizando el sistema API 50 CHL; sus resultados mostraron que se logró la identificación de 38 cepas pertenecientes a cualquiera de estas dos especies: *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus paraplantarum*.

Papamanoli y col. (2003) aislaron e identificaron 147 cepas de bacterias lácticas de dos diferentes tipos de embutidos secos fermentados en cuatro diferentes procesos de maduración. Ellos utilizaron para su identificación pruebas bioquímicas

y sistema API 50 CHL. Sus resultados mostraron que el 42.8 % de las cepas fueron *L. sake* y un 8 % de *L. curvatus*, en el primer producto fermentado, en el segundo productos fermentado obtuvieron que el 6.9 % de las cepas fueron *E. faecium* y el 13.8 % de *L. curvatus*. Estas cepas son predominantes en varios productos cárnicos fermentados, debido a que se utilizan como cultivos iniciadores y pueden inhibir *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Un total de 89 cepas de BAL fueron aisladas de cinco muestras de carne de res empaquetada al vacío a las 2 y 6 semanas de almacenamiento a 2 °C. Estas cepas fueron comparadas con cepas gram positivas de referencia e identificadas usando electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales, caracterización bioquímica y la secuenciación del gen 16S ADNr. Las característica bioquímica y fisiológica de los aislados fueron parecidos a cepas de *Lactococcus piscium* GTC 552T. El análisis numérico electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales también dieron como resultado cepas de *Lactococcus piscium* GTC 552T. Sin embargo, en la secuenciación del gen 16S ADNr, se identificaron cepas diferentes de *Lactococcus piscium* GTC 552T por dos o tres bases en la región altamente variable de la secuencia. Ellos concluyeron que la microflora predominante en la carne de res empaquetada al vacío refrigerada es *L. piscium* GTC 552T (Sakala y col., 2002).

En otros estudios (Holley y col., 2002) identificaron cepas de *Carnobacterium viridans* sp. aisladas de bologna utilizando análisis de secuenciación de ADN del gen 16S ARNr y el sistema API 50 CHL.

Santos y col. (2005) identificaron bacterias lácticas aisladas de un embutido de sangre español (morcilla de Burgos) utilizando características fenotípicas, bioquímicas y moleculares. Estos autores reportaron, que la caracterización fenotípica basada en el patrón de fermentación de azúcares, no provee suficientes bases para la identificación real de BAL, sino que solamente son usadas para una clasificación presuntiva.

7.2.2 Métodos moleculares

Existen diversos métodos para la identificación de las bacterias lácticas, sin embargo, algunas especies bacterianas no pueden, con los métodos tradicionales, diferenciarse de especies muy cercanas. Para estas especies existen métodos moleculares que resultan más convenientes, tales como: la comparación de secuencias del gen 16S y 23S ARNr (Chagnaud y col., 2001; Du Plessis y col., 2003), patrón de restricción y ribotipo del gen ARNr (Lyhs y col., 2002), electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales (Sánchez y col., 2003), hibridación con sondas de ARNr, el análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción del DNA total o de un gen, el RAPD (polimorfismo de DNA amplificado al azar), la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) de productos de PCR de regiones específicas de un gen, por mencionar algunos. El desarrollo de estos métodos moleculares ofrece la posibilidad de mejorar la identificación bacteriana. Sin embargo, en algunos casos el 16S y 23S ARNr no pueden ser usados en especies cercanamente relacionadas, debido a la similitud de secuencias

ARNr, por lo que los métodos moleculares pueden ser complementados con la identificación bioquímica de colonias aisladas (Aymerich y col., 2003). Stackebrandt y Goebel (1994) reportan que cepas de BAL que contengan 3 % o menos de diferencia entre sus genes 16S ARNr son consideradas las mismas especies.

Cocolin y col. (2000) realizaron la identificación de una cepa de *Lactobacillus spp.*, aislada de un embutido fermentado italiano, utilizando un método rápido basado en la amplificación de un fragmento del gen 16S ARNr, seguido de un gel de electroforesis con gradiente de temperatura (TGGE). Ellos concluyeron que el método PCR-TGGE puede ser una alternativa, rápida para la identificación de bacterias, ya que además de ser confiable sus resultados pueden obtenerse en 8 h.

Andrighetto y col. (2001) evaluarón el uso de RAPD-PCR como un método para la identificación de 53 cepas de *Lactobacillus* aislados de embutidos fermentados tradicionales, utilizando cebadores M13 y D8635, los cuales fueron aplicados para la identificación taxonómica y la diferenciación intraespecífica. Ellos obtuvieron como resultado, especies de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus curvatus*. Ellos concluyeron que el método RAPD-PCR puede ser aplicado para la identificación de los géneros de lactobacilos, mas comúnmente encontrados en productos cárnicos.

Roy y col. (2001) estudiaron la discriminación molecular de bacterias lácticas usadas como cultivos iniciadores y probióticos. La discriminación genética relacionada a especies pertenecientes a estos grupos fue primero obtenida por

amplificación PCR por el uso de cebadores 16S ADNr de grupos-específicos o especies-específicas. Finalmente la identificación de *Lactobacillus* fue realizada por el uso de amplificación ribosomal del ADN y por el método de análisis de restricción (ARDRA).

Ciento sesenta y uno cepas de bacterias lácticas fueron identificadas con base en su morfología y características bioquímicas; de acuerdo a estas características se dividieron en 10 grupos de los siguientes géneros: *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*. Se utilizó el análisis de secuenciación 16S ADNr para confirmar la presencia de estos grupos, obteniendo como resultado un 98.7 - 99.8 % de similitud entre los 2 métodos (Ennahar y col., 2003).

Cocolin y col. (2004) describieron la aplicación de un enfoque polifásico que incluye morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia para investigar la dinámica y la taxonomía de la población en embutidos frescos, con el uso de métodos de cultivos dependientes e independientes, para el estudio de la ecología de embutidos frescos durante 10 días de almacenamiento a 4 °C. Las muestras fueron sujetas a un análisis tradicional microbiológico, una extracción de ADN y ARN, seguida de una reacción de PCR y una transcripción reversa RT-(PCR), con cebadores capaces de detectar poblaciones de bacterias y levaduras, también se realizó un análisis de DGGE en los productos amplificados. Los resultados obtenidos encontraron dos especies principales, *Brochothrix thermosphacta* y

Lactobacillus sakei, fueron determinadas por análisis de ADN y ARN, y otras especies como *Staphylococcus xylosus*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus curvatus*, las cuales fueron detectadas por DGGE. Estas pruebas conducen a la conclusión de que el embutido fresco puede contener aún especies bacterianas no identificadas.

Rantsiou y col. (2005) estudiaron 358 cepas de bacterias lácticas las cuales fueron aisladas e identificadas por PCR-DGGE y secuenciación. Se obtuvieron tres especies de *Lactobacillus*: *L. plantarum*, *L. curvatus* y *L. sakei*, estas cepas fueron sujetas a RAPD-PCR, seguidas por una serie de análisis para obtener una caracterización genética. Ellos encontraron, que la aplicación de métodos moleculares para la identificación de poblaciones de bacterias aisladas de productos fermentados, permite un mayor conocimiento de la flora de estos productos.

8 TERMOTOLERANCIA

Las bacterias lácticas tienen temperatura óptima de 20 °C y 45 °C. Sin embargo, se ha encontrado que algunas bacterias lácticas pueden sobrevivir al tratamiento térmico.

Muchos factores son los que influyen en la resistencia de las bacterias al calor, entre ellos tenemos la fase de crecimiento en la que se encuentran, la actividad de agua, el pH del medio, la concentración de sal, azúcares y carbohidratos, y la

cantidad de grasa (Stumbo, 1973) así como su estructura celular (Farkas y col., 1999).

8.1 Proteínas del Choque Térmico

Existen proteínas responsables de la termotolerancia adquirida por algunos microorganismos. A estas proteínas se les denomina proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins) y pertenecen a una familia que se encuentra, en su mayor parte, en forma constitutiva en todas las células procariotas y eucariotas. Frente a determinadas agresiones ambientales, los organismos reaccionan con un mecanismo de defensa celular que involucra la sobreexpresión de estas proteínas y la inducción de otras. Su función es minimizar los daños producidos por el estrés (Coronato y col., 1999). Las proteínas HSP se encuentran entre las proteínas mejor conservadas filogenéticamente en la historia evolutiva de los organismos, con respecto a su función y estructura, cumpliendo un papel similar en todos los organismos (bacterias, levaduras, plantas y células animales) (Feder, 1999).

Las HSP siempre están presentes en las células, aunque su concentración aumenta en situaciones de estrés. Se cree que su función principal es asistir el plegamiento de algunas proteínas recién sintetizadas, algunas se pliegan espontáneamente, por lo que se les denominan **chaperonas moleculares**. Estas chaperonas no forman parte de la estructura primaria de la proteína funcional, sino que sólo se unen a ella para ayudar en su plegamiento, ensamblaje y transporte celular a otra parte

de la célula donde la proteína realiza su función. Los cambios de conformación tridimensional de las proteínas pueden estar afectados por un conjunto de varias chaperonas que trabajan coordinadas, dependiendo de su propia estructura y de la disponibilidad de las chaperonas (Prescott y col., 1999). Las clases de las chaperonas moleculares se componen de varias clases cuyos miembros se agrupan con base en su masa molecular, que varía entre 10000 y 150000 Da (Tabla 5).

Tabla 5 Clases de proteínas del choque térmico (Hsp) (Coronado y col., 1999)

Familia	Nombre	Localización	Función
Pequeñas Hsp	p20	Citoplasma	Vaso relajación
	Hsp 22 o α B- <i>crystallin</i>	Citoplasma y núcleo	Estabilización del citoesqueleto
	Hsp 25 (ratón)	Citoplasma/núcleo	<i>Chaperona</i> , dinámica de la actina
	Hsp 27 (humana)	Citoplasma/núcleo	
Hsp 40	Hsp 40	Citoplasma	<i>Chaperona</i>
	Hsp 47	Ret. endoplásmatico	Control en síntesis de colágeno
Hsp 60	Hsp 58	mitocondrias	<i>Chaperonas</i>
	Hsp 60		
Hsp 70	Hsp 70 (73)	Citoplasma	<i>Chaperonas</i>
	Hsp 70 (72)	Citoplasma/núcleo	
	Hsp 75	Mitocondrias	
	Grp 78*	Ret. endoplásmatico	
Hsp 90	Hsp 90 α (86)	Citoplasma	Unión a receptores de hormonas esteroides
	Hsp 90 β (84)	Citoplasma	
	Grp 94*	Ret. endoplásmatico	<i>Chaperona</i>
Hsp 110	Hsp 105	Citoplasma	<i>Chaperonas</i> ,
	Hsp 110	Citoplasma/núcleo	Citoprotectoras

Los números entre paréntesis corresponden a otras denominaciones de las mismas proteínas.

*Grp: proteínas relacionadas con glucosa, inducidas por anoxia y privación de glucosa

Las proteínas HSP son proteínas muy importantes para mantener la viabilidad de ciertas células al conservar la estabilidad durante un choque térmico. Teniendo actividad de chaperonas moleculares, que pliegan proteínas nuevas o

desnaturalizadas, las que ayudan a mantenerse en un estado competente durante el periodo de estrés, para poder ser plegadas de nuevo luego del choque térmico. De esta manera son responsables, en parte de la termotolerancia adquirida por algunos microorganismos (Kyu y col., 1998).

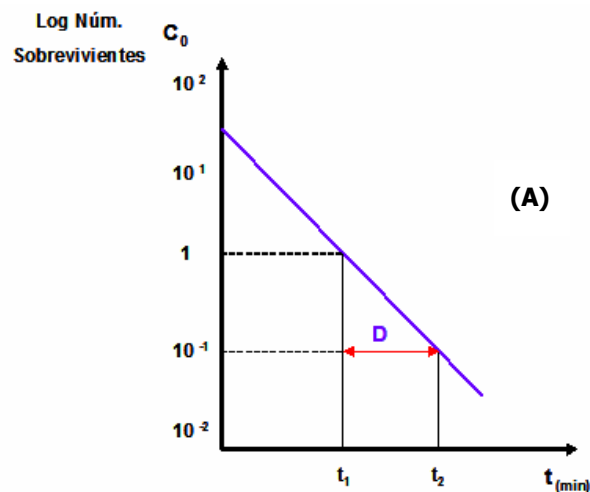
8.1.1 Mecanismo de Acción de las Hsp

Las proteínas son macromoléculas que están compuestas por la unión de aminoácidos en cadenas que se pliegan para adquirir una estructura tridimensional, llamada estructura terciaria que es la que permite a la proteína realizar su función. Las situaciones de estrés como el calor, altera la estructura terciaria de las proteínas, desplegando las cadenas de aminoácidos, exponiendo los aminoácidos hidrofóbicos al agua y provocando la pérdida de función de la proteína. Este fenómeno se denomina *desnaturalización de las proteínas*. Las proteínas desnaturalizadas se agregan al atraerse entre sí por sus aminoácidos hidrofóbicos. Las HSP ayudan a la célula a conservar o degradar las proteínas desnaturalizadas, uniéndose a ellas para evitar que se agreguen, marcándolas para luego destruirlas, o manteniendo las cadenas de polipéptidos desplegadas en un *estado competente*, para que una vez que el estrés haya cedido, puedan volver al plegamiento inicial, recuperar su estructura tridimensional y por lo tanto recuperar su función. Aunque en el estado competente la proteína no puede realizar su función por no estar plegada en su estructura terciaria, los aminoácidos que componen la proteína siguen unidos en su estructura primaria, dispuestos para

adquirir la estructura tridimensional; pero todos los aminoácidos que la componen siguen unidos en su estructura primaria, listos para ser plegados de nuevo (Georgopolous y Welch, 1993).

8.2 Valor D

La temperatura de procesamiento y el tiempo necesarios para producir seguridad en un producto, es determinada por el uso de dos parámetros que son: el valor D , que está definido como el tiempo necesario para reducir un 90 % de una población microbiana a una temperatura determinada (Figura 2A) y en la Figura 2B se muestra el valor z , que es el tiempo en minutos a una temperatura determinada, necesario para destruir una población microbiana (Silla, 1992).



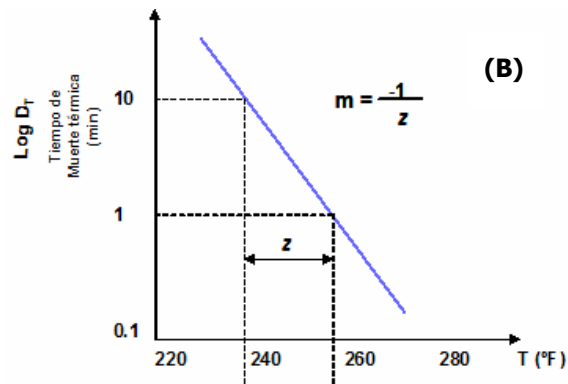


Figura 2 (A) Curva de supervivencia y (B) Curva del tiempo de destrucción térmica (Silla, 1992).

Quintavalla y Campanini (1991) evaluaron la resistencia al calor de *Listeria monocytogenes* la cual se determinó tanto en caldo biotriptasa (TSB) y en emulsión cárnica. Los valores D para la emulsión cárnica fueron aproximadamente de dos a tres veces superiores a las de caldo y el valor z aumentó significativamente, desde 6.0 a 6.8 ° C. La *Listeria monocytogenes* ha demostrado ser más resistentes cuando se calienta lentamente (0.5 °C / min) a temperatura constante de 60, 63 y 66 ° C en la emulsión cárnica.

Los valores D obtenidos para D_{60} , D_{63} y D_{66} , fueron 12.95, 5.4 y 2.3 min. Respectivamente concluyeron que los resultados pueden tener implicaciones en la sobrevivencia de *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos, en los alimentos que han recibido sólo un mínimo tratamiento térmico.

Franz y von Holy (1996) estudiaron la termotolerancia de tres bacterias lácticas (*Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* y *Leuconostoc mesenteroides*) *in vitro* a temperaturas de 57, 60 y 63 °C; ellos obtuvieron valores *D* para *L. sake* de 52.9, 39.3 y 32.5 s, para *L. curvatus* de 22.5, 15.6 y 14.4 s y para *L. mesenteroides* de 34.9, 31.3 y 20.2 s respectivamente, teniendo como resultado que las tres bacterias lácticas fueron sensibles al calentamiento, reduciendo un ciclo logarítmico a 57 °C en menos de 60 s.

Lee y Kaletunc (2002) evaluaron la entalpía aparente de células de *E. coli*, utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC) que permite la caracterización termodinámica de los cambios conformacionales inducidos por cambios de temperatura en proteínas. Después de un pretratamiento en el calorímetro a varias temperaturas entre 56-80 °C. Ellos determinaron calorimétricamente los valores *D* y *z* que fueron comparados con los datos obtenidos por conteo en placa bajo condiciones isotérmicas. Concluyendo que los valores *D* calculados por los datos de viabilidad y por calorimetría son similares, donde las poblaciones microbianas redujeron 10 ciclos logarítmicos calculados por los datos de conteo en placa y entalpía.

8.3 Bacterias Lácticas Termotolerantes y su Uso en Productos Cárnicos

Petaja (1991) estudió la sobrevivencia de bacterias lácticas y *Pseudomonas* después del tratamiento térmico en productos cárnicos hechos de carne de cerdo.

Todas las *Pseudomonas* sobrevivieron el calentamiento a 72 °C después de 60 min en caldo APT; sin embargo, solo sobrevivieron 15 min en el producto cárnico a 72 °C. Por ello concluyó que estos microorganismos no constituyen un factor de descomposición en productos cárnicos cocidos; no obstante, algunas cepas de BAL pudieron sobrevivir después del calentamiento térmico a 72 °C por 30 minutos.

La mayoría de bacterias perjudiciales para la salud del consumidor son de tipo Gram (+) en los alimentos tratados térmicamente, y corresponden a los géneros *Bacillus* y *Clostridium*; ambos géneros capaces de formar esporas resistentes a altas temperaturas y sobrevivir a los procesos térmicos industriales (Silla, 1992).

En los productos cárnicos el desarrollo de microorganismos es posible entre -15 y 70 °C. Las innumerables especies microbianas, no obstante, no se desarrollan en los distintos tipos de temperaturas sino dentro de un intervalo más o menos limitado (Wirth, 1992).

Las bacterias lácticas termofílicas tienen diferentes condiciones de sobrevivencia durante el almacenamiento en congelado. Fonseca y col. (2001) midieron esa resistencia cuantificando la disminución de la actividad acidificante durante ocho semanas de almacenamiento en congelación; *Streptococcus thermophilus* fue más resistente que *Lactobacillus bulgaricus* y se confirmó el efecto crioprotector del glicerol durante el congelado y almacenamiento.

Gouesbet y col. (2001) investigaron la influencia del estrés del calentamiento sobre la viabilidad de *Lactobacillus bulgaricus* en un medio químicamente definido; ellos

encontraron que la adquisición de termotolerancia es un resultado de la exposición a un choque de calentamiento moderado y la adquisición de una tolerancia cruzada al estrés por exposición osmótico.

Marceau y col. (2003) evaluaron en sus estudios el crecimiento de *Lactobacillus sakei* en un medio químicamente definido utilizando altas temperaturas y altas concentraciones de NaCl. Sus resultados mostraron que *L. sakei* es capaz de adaptarse a estas condiciones ambientales y puede crecer durante periodos largos.

En resultados previos en nuestro laboratorio, Victoria y col. (2006) evaluaron la capacidad termotolerante de 8 cepas de bacterias lácticas; se encontró que sólo 4 cepas pudieron resistir la temperatura de 72 °C durante 30 minutos, posteriormente estas cepas se inocularon en un batido cárnico encontrando que las bacterias lácticas disminuían considerablemente el conteo de enterobacterias durante el almacenamiento. Se concluyó que las BAL que pueden sobrevivir al tratamiento térmico de productos cárnicos cocidos podrían ser una alternativa para mejorar la vida de anaquel de estos productos.

Recientemente se han descubierto nuevas especies de bacterias lácticas las cuales se han identificado como *Lactobacillus thermotolerans* que tienen características bioquímicas, fisiológicas y taxonómicas que las distinguen del genero *Lactobacillus*, y su importancia radica en que pueden sobrevivir a temperaturas altas (Niamsup y col., 2003). Sin embargo, la sobrevivencia de microorganismos a temperaturas

arriba de la temperatura óptima de crecimiento puede causar un número de cambios fisiológicos, bioquímicos y morfológicos (Beales, 2004).

9 PROBIÓTICOS

9.1 Definición

Lilly y Stilwell (1965) utilizaron el término probiótico para describir aquellas sustancias secretadas por un organismo que estimula el crecimiento de otro, en contraposición del término antibiótico, entendiendo como cualquier compuesto químico utilizado para eliminar o inhibir el crecimiento de organismos infecciosos. Sin embargo, el concepto, que parecía adecuado, no era totalmente correcto, ya que probióticos son todas las sustancias producidas por microorganismos vivos inhiben el crecimiento de microorganismos patógenos, mejorando la flora intestinal.

Parker (1974) fue el primero en usar el término probiótico de acuerdo con el sentido que hoy conocemos, es decir, organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio intestinal. Fuller (1989) intentó mejorar la definición hecha por Parker, y definió probiótico como un suplemento de microorganismos vivos que beneficia al huésped mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal.

Desde entonces, la definición de probiótico ha evolucionado notablemente, de forma que hoy se define como microorganismos vivos, principalmente bacterias, usados en forma de suplemento nutricionales que, tras ser ingeridos en cantidad suficiente, mejoran el equilibrio microbiano en el intestino de las personas o

animales que los ingieren, provocando efectos beneficiosos sobre su salud, más allá de los efectos nutricionales tradicionales. Para proveer beneficios para la salud, la concentración sugerida de una bacteria probiótica un producto es de 10^6 ufc/g y para lograr los efectos benéficos esto puede ser solo por células viables ingeridas (Shah, 2000).

9.2 Características

La selección de una cepa como probiótico requiere que cumplan algunos criterios importantes en el tracto intestinal en los cuales se encuentra:

- a) Sobrevivencia a través del tracto gastrointestinal, a bajo pH y contacto con bilis
- b) Tener la habilidad para adherirse a la mucosa intestinal.
- c) Mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal humano.
- d) No ser patógeno, ni tóxico.
- e) Sobrevivencia en alimentos.
- f) Producir sustancias antimicrobianas (Saarela y col. 2000).

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las bacterias lácticas, que se agrupan en gran cantidad de géneros que incluyen un considerable número de especies (Vaughan y col., 2002). Las cepas utilizadas generalmente pertenecen a especies de los géneros *Lactobacillus*,

Enterococcus y *Bifidobacterium*. En la Tabla 6 se muestran los principales microorganismos utilizados como probióticos.

Tabla 6 Microorganismos usados como probióticos (Macfarlane y Cummings, 1999; Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001;)

<i>Lactobacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Bifidobacterium</i> <i>spp.</i>	<i>Streptococcus</i> <i>spp.</i>	<i>Enterococcus</i> <i>spp.</i>	<i>Bacillus</i> <i>spp.</i>	<i>Saccharomyces</i> <i>spp.</i>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>S. thermophilus</i>	<i>E. faecium</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. casei</i> (<i>rhamnosus</i>)	<i>B. longum</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. infantis</i>				
<i>L. bulgaricus</i>	<i>B. breve</i>				
<i>L. plantarum</i>	<i>B. lactis</i>				
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>				
<i>L. lactis</i>					
<i>L. gasseri</i>					
<i>L. GG</i>					
<i>L. casei</i> <i>Shirota</i>					

La actividad antagónica de las bacterias lácticas resulta principalmente de la formación de ácidos, la transformación de carbohidratos en ácido láctico y acético lleva a disminuir el pH del medio (Lee & Salminen, 1995), el cual inhibe el

crecimiento de microorganismos patógenos y deteriorantes, siendo esta una característica para la evaluación de los probióticos (Saarela y col., 2003).

El efecto probiótico de las bacterias lácticas puede basarse parcialmente en la producción de concentraciones relevantes de ácido láctico en el microambiente, el cual, en combinación con detergentes como sales biliares inhibe el crecimiento de bacterias patógenas Gram negativas (Alakomi y col., 2000).

9.3 Mecanismo de acción de bacterias probióticas

Los principales mecanismo que ejercen los probióticos como efecto protector y terapéutico son totalmente incierto, sin embargo, se han postulado múltiples mecanismos en los que se destacan: mantenimiento de la mucosa intestinal, resistencia a enfermedades infecciosas; prevención de vaginitis; producción de metabolitos antimicrobianos; inmunomodulación; alivio de la constipación y prevención de la diarrea asociada con antibióticos; desintoxicación de metales; reducción del colesterol sérico y la presión arterial; prevención y alivio de las enfermedades alérgicas; disminución en los síntomas de la dermatitis atópica; prevención de la infección de la herida quirúrgica y la caries dental; reducción en la regresión tumores cancerígenos; Disminución en los síntomas de intolerancia a la lactosa, reduciendo la concentración de la misma en leche fermentada por actividad de la lactasa bacteriana durante la fermentación (Ahmend, 2003).

Una parte fundamental de la funcionalidad de las bacterias probióticas es estimular su sobrevivencia y permanencia prolongada en el tracto gastrointestinal. Estos

probióticos pueden producir sustancias antimicrobianas, tales como: la producción de ácidos orgánicos; como los ácidos láctico y acético, bacteriocinas y otros metabolitos primarios como el peróxido de hidrógeno y el dióxido de carbono. La producción de ácidos orgánicos por las bacterias probióticas disminuye el pH intestinal y por lo tanto se inhibe el crecimiento de patógenos. Estos ácidos orgánicos incrementan los movimientos peristálticos, lo que de manera indirecta remueve los patógenos acelerando la velocidad con la que atraviesan el intestino (Kailasapathy y Chin, 2000). El futuro de los alcances de las investigaciones de probióticos es ilimitado.

9.4 Evaluación de las Bacterias Lácticas Como Probióticos

Existe una gran diversidad de estudios sobre el uso de bacterias lácticas como probióticos. Ehrmann y col. (2002) evaluaron *in vitro* 112 bacterias lácticas con potencial probiótico; a todas las cepas se les realizaron análisis de agregación, co-agregación, hidrofobicidad en la superficie celular, actividad de adhesión en corte de células de ave y células HEp-2 de humano y tolerancia a pH ácidos. Ellos concluyeron que dos cepas de *Lactobacillus* (*Lactobacillus animalis* y *Lactobacillus salivarius*) exhiben un fuerte potencial como probióticos adjuntos.

Työppönen y col. (2003) estudiaron el efecto bioprotector y probiótico de las bacterias lácticas en productos cárnicos fermentados; ellos encontraron que la producción de metabolitos y compuestos de bajo peso molecular pueden ser una de las características para la exclusión de patógenos y la sobrevivencia de las

bacterias lácticas en el intestino; sin embargo, ellos realizaron este estudio en embutidos fermentados debido a que no llevan un tratamiento térmico.

Pennacchia y col. (2004) aislaron 150 cepas de *Lactobacillus* de 10 diferentes embutidos fermentados, las cepas fueron sometidas a ambientes hostiles como la sobrevivencia a pH bajos y el crecimiento en la presencia de sales biliares, para ser seleccionadas como posibles probióticos. Ellos reportaron que sólo 28 cepas de *Lactobacillus* mostraron una sobrevivencia mayor al 80 % a pH 2.5 por 3 h y con 0.3 % de sales biliares; ellos concluyeron que estas cepas pueden tener un valor probiótico, sin embargo, se requieren más estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, como la adhesión a células epiteliales intestinales y la actividad antagónica a microorganismos patógenos para poder considerarlas probióticas.

En otro estudio de Pennacchia y col. (2006) seleccionaron 25 cepas de *Lactobacillus*, las cuales 13 cepas eran pertenecientes a la especie de *L. plantarum*; se identificaron a nivel de especie por un ensayo de PCR multiplex, dando como resultado especies de *L. paraplantarum* y *L. pentosus*. Ellos encontraron que las cepas parecen tener una buena capacidad de adhesión a células Caco-2, mostrando el mayor número final ($> 6.5 \times 10^7$ ufc / pozo) de la adhesión de células viables. Ellos concluyeron que las cepas de *Lactobacillus* estudiadas podrían seguir siendo investigadas para evaluar *in vivo* los posibles beneficios para la salud humana.

Iñiguez y col. (2007) aislaron 62 cepas de *Lactobacillus* del intestino delgado de 6 lechones, las cuales fueron identificadas como *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus mucosae*. A estas cepas se les realizaron pruebas para conocer su resistencia a valores bajos de pH y sales biliares, la actividad autoagregativa y el efecto antagónico contra *E. coli* K88, esto para poder ser usadas como probióticos. Ellos reportaron que 20 cepas de *Lactobacillus* resistieron la presencia de pH bajos y sales biliares y 8 de ellas fueron adherentes e inhibieron el crecimiento de *E. coli* K88; por lo tanto, concluyeron que 8 cepas de *Lactobacillus* que pertenecen a la especie *Lactobacillus salivarius* tienen valor probiótico.

Rashid y col. (2007) evaluaron las características probióticas (valores bajos de pH, producción de ácido, tolerancia de ácidos, sales biliares y la actividad inhibitoria) de bacterias lácticas aisladas de leche fermentada "Dahi" en Bangladesh. Entre las cepas probadas, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* M3403 mostró una mayor tolerancia en medio ácido, así como mayor producción de éste (2.13 %). Mientras que, la más alta actividad antimicrobiana la tuvieron especies de *Streptococcus bovis* J2 402 y *Streptococcus thermophilus*. Por otra parte, *Lactobacillus fermentum* exhibió fuerte tolerancia a ácidos biliares con un 95.5 % seguida de *Enterococcus faecium* con 88.6 %, *Lactococcus lactis* 74.4 %, *Lactococcus raffinolactis* 72.3 % y *Pediococcus pentosaceus* 65.6 %. De los resultados obtenidos, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* podría ser

utilizado como cultivo probiótico iniciador en la fermentación de la leche debido a la alta producción de ácido y la tolerancia a altas concentraciones ácidas del medio. *Streptococcus bovis* J2 40 2 y *S. thermophilus* son las únicas cepas detectadas con mayor actividad inhibitoria y se sugiere que deberían ser utilizadas como cultivo iniciador en alimentos lácteos fermentados.

Todorov y col. (2008) estudiaron cepas de *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. pentosus* y *L. paracasei* aisladas de Boza (bebida tradicional de una región de Balkan). En este trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana, la tolerancia a jugo gástrico, la tolerancia a sales biliares y la posibilidad de adherirse a células HT-29 y Caco-2; ellos obtuvieron como resultado que todas las cepas estudiadas sobrevivieron a un pH 3.0 y crecieron bien a pH 9.0, no hubo inhibición a 0.3 % de sales biliares, además producen la bacteriocina bacST284BZ la cual revela alta actividad contra el virus herpes simples tipo 1 ($EC_{50}=735 \mu\text{g} / \text{mL}$), por otra parte, presentaron del 67 a 99 % de autoagregación y coagregaron con *Listeria innocua*. Se observó una adhesión que oscilaba entre el 18 y el 22 %. Por lo tanto, concluyeron que Boza es una rica fuente de bacterias lácticas probióticas.

CAPITULO II: IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS TERMOTOLERANTES AISLADAS DE PRODUCTOS CÁRNICOS COCIDOS

10 OBJETIVO

Identificar fenotípica y genotípicamente bacterias lácticas previamente aisladas de productos cárnicos cocidos, así como evaluar la resistencia térmica mediante la determinación del valor *D*.

11 PROLEGÓMENO

Las bacterias lácticas (BAL) son Gram positivas, cocos o bacilos no esporulados, microaerófilas y tiene como principal producto de la fermentación de carbohidratos al ácido láctico. Existe cierta controversia en cuanto a los límites exactos del grupo, pero los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el centro histórico de éste. La revisión taxonómica de este género y la descripción de géneros nuevos puede eventualmente llevar hasta 20 géneros dentro del grupo de BAL basados en sus características fisiológicas (Axelsson, 2004).

Al principio el perfil de la microflora bacteriana en productos cárnicos almacenados al vacío y en refrigeración se ve desplazada gradualmente por microorganismos anaeróbicos y tolerantes de CO₂ principalmente BAL (von Holy y col., 1991). El crecimiento de bacterias lácticas es promovido por las condiciones encontradas en productos cárnicos cocidos y curados, tales como el pH cerca de 6.0, actividad de agua relativamente alta (~ 0.96), concentración de sal de 2.5-3.0 % y la presencia

de nitritos (Sutherland y Varnam, 1982; Marshall y Bal'A, 2001). No obstante, la contribución de las BAL a la contaminación inicial de los embutidos es insignificante (Sachindra y col., 2005).

El proceso térmico reduce considerablemente la población microbiana en productos cárnicos cocidos, pero muchas BAL pueden sobrevivir al tratamiento térmico, haciéndolas microorganismos predominantes naturales en la carne, los mataderos y las instalaciones de procesamiento. Pētaja (1991; 1992) reporta que algunos bacilos y cocos Gram negativos aislados de la superficie y del interior de productos cárnicos fueron capaces de sobrevivir a 72 °C por 30 min en caldo APT. Resultados similares fueron reportados por Milbourne (1983) en el cual *L. viridiscens* sobreviven después del calentamiento en baños de agua a 65 °C. Franz y von Holy (1996) sometieron bacterias lácticas a un doble tratamiento térmico antes de la inoculación en salchichas lo cual incrementó la tolerancia térmica de estas cepas. Esta termotolerancia hace que ciertas cepas de BAL sean prometedoras para utilizarse en sistemas cárnicos cocidos. Victoria-León y col. (2006) inocularon 4 cepas identificadas como termotolerantes en un batido cárnico. Las 4 cepas fueron capaces de inhibir el crecimiento de enterobacterias demostrando su potencial bioprotector. En otro estudio, Pérez-Chabela y col. (2008) reportan que la inoculación de especies termotolerantes *L. plantarum*, *L. curvatus*, *P. pentosaceus*, *P. acidilacti* en embutidos cocidos no tienen un efecto significativo en parámetros de color y propiedades de textura tales como cohesividad y resiliencia; la excepción

fue *L. curvatus*, el cual produce muestras más suaves y por consiguiente una aceptación pobre.

Las propiedades de termotolerancia de las BAL hacen posible su uso como cultivos iniciadores en la elaboración de productos cárnicos curados y cocidos porque sobreviven al tratamiento térmico y se convierten en la flora dominante durante el almacenamiento al vacío. Además la identificación de estas cepas termotolerantes como BAL homofermentativas permitirían su aplicación como cultivos bioprotectores en estos productos cárnicos debido a los metabolitos que producen tales como: ácidos orgánicos, alcoholes, CO₂, H₂O₂, y bacteriocinas (Helander y col., 1997).

12 METODOLOGÍA

12.1 Aislamiento de Bacterias Lácticas

Se tomaron 10 g de salchichas de diferentes marcas (Alpino, Fud, San Rafael, Parma, Zwan, Rioni y Don Fer) que se expenden en la Cd. de México. Se homogenizó cada una con 90 mL de agua destilada estéril, se inoculó 0.1 mL en agar MRS (De Man y col., 1960) Difco, No. Cat. 288130, (Detroit, Mich., EUA); las cajas se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h. Después de este tiempo, se aislaron diferentes colonias y se les realizó la tinción de Gram, las bacterias Gram positivas se inocularon en tubos inclinados con agar MRS y se almacenaron a 4 °C hasta su posterior uso.

12.2 Identificación Bioquímica

Se realizó primero la prueba de actividad de catalasa y oxidasa a las cepas que resultaron Gram positivas, para confirmar que las cepas fueran BAL. Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas: crecimiento a 20 y 45 °C el cual fue determinado incubando las bacterias en caldo MRS durante 24 h; crecimiento en presencia de 6.5 % de cloruro de sodio en caldo MRS durante 72 h a 35 °C +/- 2 °C. Crecimiento bajo condiciones anaerobias incubando en agar MRS a 30 °C durante 72 h a -20 psi; motilidad utilizando agar SIM (sulfuro, indol, motilidad) incubando a 30 °C. La actividad de reducción de nitritos fue estudiada en medio nitrato tríplico durante 24 h de incubación y utilizando 0.33 % de ácido sulfanílico

en 30 % de ácido acético y 0.5 % dimetil- α -naftilamina en 30 % de ácido acético para determinar la capacidad de un microorganismo de reducir los nitratos a nitritos. La hidrólisis de arginina fue determinada a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h en caldo MRS con 0.3 % de L-arginina; la reacción de bilis esculina fue probada en agar esculina incubado a 35 °C +/- 2 °C durante 48 h. Capacidad de acidificación y coagulación se estudió incubando a 20 y 45 °C durante 48 h en medio de leche tornasolada. Finalmente, la producción de gas (CO₂) fue determinada en medio Gibson Abd-el-Malek incubando a 30 °C durante 5 días (Harrigan, 1998; MacFaddin, 1991).

12.3 Capacidad Termotolerante

La capacidad termotolerante de las cepas de BAL homofermentativas fue determinada por el método descrito por Anderson y col. (1991) y Petäja (1992) adaptado para el presente estudio.

Las cepas de BAL fueron resembradas en 10 mL de caldo MRS e incubadas a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h, hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=650$ nm) de 1.0 (correspondiente a 10⁸ ufc / mL), la cual se midió en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (Palo Alto, California, EUA). Los tubos se sumergieron verticalmente en un baño de agua (VWR Scientific, modelo 1202, Oregon, EUA) y se mantuvieron a 50, 60 y 70 °C durante 15, 30, 45 y 60 min. Después del tratamiento térmico, se cuantificó la supervivencia de las cepas inoculando 0.1 mL de cada cultivo tratado en cajas con agar MRS incubando a 35 °C +/- 2 °C durante

24 h. Si las cepas exhibían abundante crecimiento (> 300 ufc / mL) fueron consideradas termotolerantes (Petaja, 1991) y empleadas en análisis subsecuentes, esta parte corresponde a los resultados de la Maestría pero se consideró importante incluirlos para que fueran más entendibles los siguientes resultados.

12.4 Determinación del Valor D

La temperatura y el tiempo de reducción decimal (valor D), que es el tiempo requerido para reducir el número de células viables en 90 % a una temperatura dada, fueron evaluadas a diferentes temperaturas entre 60 y 80 °C y fue calculada con la siguiente Ecuación 1:

Ecuación 1 Tiempo de reducción decimal (Silla, 1992).

$$D_t = \frac{u}{\log a - \log b}$$

Donde:

u = tiempo de tratamiento en minutos a temperaturas de 60 a 80 °C

a = Número inicial de microorganismos.

b = Número de microorganismos sobrevivientes.

12.5 Identificación Fenotípica

Se realizó a las cepas BAL homofermentativas y que sobrevivieron tratamientos térmicos de 70 °C la identificación fenotípica mediante la determinación del perfil de fermentación de carbohidratos utilizando el sistema API 50 CH y medio API 50 CHL (bioMérieux, Lyon, France). Las pruebas fueron incubadas a 35 °C +/- 2 °C durante 24 y 48 h, la observación del cambio de color de cada prueba, indica fermentación de la correspondiente fuente de carbono. Los microorganismos fueron identificados usando el Software APILAB Plus versión 3.3.3 (bioMérieux) y la base de datos en la computadora Analytab Products para la comparación de asimilación y/o patrones de fermentación.

12.6 Identificación Genotípica

12.6.1 Extracción de ADN

La identificación genotípica fue realizada con el análisis de comparación de secuencias del gen ARNr 16S. Mediante la técnica de Lawson y col. (1993). Se colocaron, 500 µL de una solución amortiguadora TES (Tris 50 mM, EDTA 5 mM y NaCl 50 mM pH 8.0), posteriormente se tomó una muestra bacteriana con un asa estéril, se suspendió en el buffer y se adicionó 20 µL de lisozima (10 mg/µL), se agitó vigorosamente e incubó a 37 °C durante 30 min en un baño de temperatura controlada (VWR Scientific, modelo 1202, Oregon, EUA) hasta obtener una consistencia viscosa; el tiempo máximo de incubación fue hasta 60 min. Una vez

transcurrido este tiempo se le adicionó 8 μ L de cada una de estas enzimas: Proteinasa K (20 mg/ μ L) Sigma, N°. Cat. T1503-1 EC 201-064-4 (St. Louis, USA) y RNasa, Sigma, N°. Cat. T1121 (St. Louis, USA) se agitó vigorosamente e incubó a 65 °C en un baño de temperatura controlada PolyScience modelo 71 (Oregon, USA) 1 h, este tiempo debe de ser exacto. Una vez pasado el tiempo de incubación se adicionaron 120 μ L de SDS al 10%, posteriormente se colocó inmediatamente en un baño de agua a 65 °C durante 10 min, se sacó del baño de agua y se dejó enfriar. Se adicionó una mezcla de volúmenes iguales de fenol/cloroformo (600 μ L), y se agitó vigorosamente hasta formar una emulsión. Se centrifugó en una microcentrífuga Beckman (Palo Alto, California, E.U.) a velocidad baja de 12 000 g durante 10 min. Se formaron tres capas, la capa acuosa superior contiene el ADN, una capa en medio que contiene proteína/restos de células, y la capa de abajo que es el solvente. Con cuidado se tomó la capa superior y se colocó en un micro tubo. Si la solución es turbia, se adiciona TES hasta aclarar la solución, y se repetir el paso de fenol/cloroformo hasta no tener mas restos de materiales de proteínas. Para la solución del ADN se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 100 % a -20 °C, se mezcló suavemente, posteriormente se centrifugó a 12 000 g durante 10 min, después se retiró el líquido y se dejó secar el botón celular al aire durante 24 h y se almacenó a -20 °C.

12.6.2 Amplificación mediante PCR

Se usaron los cebadores pA y 3 (Tabla 7), específicos para bacteria, para amplificar aproximadamente 1109 pb del gen ADN_r 16S. Se realizaron reacciones de 50 µl de la mezcla de reacción: 5 µL de amortiguador 10X PCR (200 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM KCl), 5 µL de MgCl₂ (25 mM pH 8.0), 1 µL de cada dNTP (10 mM), 1 µL de Taq polimerasa (1 U/µL), 0.5 µL de cebador pA (1X), 0.5 µL de cebador 3 (1X) y 5 µL de template ADN (10ng/µL) y hasta 50 µL con agua destilada estéril.

El protocolo usado consiste de una desnaturalización inicial (94 °C por 3 min), seguido de 34 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, reconociendo el cebador a 65 °C por 1.30 min y posteriormente la elongación a 72 °C por 2 min, más un tiempo adicional de 15 min para finalizar el ciclo de la reacción. La reacción de PCR fue realizada en un termociclador Whatman Biometra T personal (Göettingen, Germany). Para comprobar la obtención del producto de PCR del tamaño adecuado, se realizaron electroforesis en gel de agarosa Invitrogen No. Cat. 155 100 27 al 0.8 %, con un marcador de peso molecular (1 kb DNA Extensión Ladder). Los productos de la amplificación del ADN fueron visualizados por fluorescencia UV fluorescente después de ser teñidos por bromuro de etidio (10 mg / mL) Bio Rad, No. Cat. 161-0433.

Tabla 7 Cebadores para PCR utilizados en este estudio

Cebador	Secuencia 5'- 3'	Posición	Orientación
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	9-28	Reversa
3	GTTGCGCTCGTTGCGGGACT	1109-1090	Hacia adelante
γ	ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG	358-339	Hacia adelante

12.6.3 Identificación por comparación de la secuenciación del gen ARNr 16S

Para la purificación del producto de PCR se utilizó un kit (Quiagen PCR clean up-kit) No. Cat. 28104, QIAGEN Inc. (Valencia, CA, USA), y se secuenciaron directamente con el método de terminación de cadena dideoxi (kit ABI PRISM, 3100 Perkin Elmer), usando un secuenciador automático Applied Biosystems modelo 373; Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Se secuenció la región hipervariable V1, con el cebador gamma (20 pmol / μ L). Las identificaciones fueron basadas en secuencia parcial de comparaciones (correspondiente a posiciones 30 a 338 del gen ARNr 16S de *E. coli*). Para determinar los parientes más cercanos de las secuencias obtenidas se realizaron búsquedas en GenBank usando el programa BLAST.

13 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13.1 Propiedades Bioquímicas y Termotolerantes

Se aislaron 68 cepas de bacterias Gram positivas. Mediante las pruebas de catalasa y oxidasa se descartaron 18 cepas. De las 40 cepas restantes, 18 cepas fueron nuevamente descartadas debido a que algunas no crecieron en 6.5 % de NaCl y/o en condiciones anaerobias y algunas cepas fueron heterofermentativas. Las 22 cepas restantes fueron etiquetadas como BAL y se sometieron al siguiente paso que fue el tratamiento térmico.

Diez cepas resistieron 70 °C durante 30 minutos, por lo que se decidió trabajar solo con estas cepas a lo largo del estudio; (Tabla 8) se muestran los resultados de la resistencia al calor de las cepas aisladas.

Tabla 8 Resistencia al calor de las cepas de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos

CEPAS	CRECIMIENTO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO TÉRMICO*											
	50 °C				60 °C				70 °C			
	15'	30'	45'	60'	15'	30'	45'	60'	15'	30'	45'	60'
BAL 15a	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
BAL 22	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
BAL 12	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
BAL 11	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
BAL 10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
BAL 21	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+	+
BAL 15c	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
BAL 18	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
BAL 17	++	++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-
BAL 15L	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-

- No hubo crecimiento + Poco crecimiento ++ Crecimiento abundante

13.2 Valor *D*

En la Tabla 9 se muestran los valores *D* obtenidos para las 10 cepas de bacterias lácticas. Las cepas 15a, 22 y 12 tuvieron valores *D* más altos, seguidos por la cepa 11 a 75 °C. Las cepas 21, 15c y 18 tuvieron valores *D* altos a 70 °C, mientras que los valores *D* mas bajos fueron para las cepas 17 y 15L.

Tabla 9 Crecimiento después del tratamiento térmico y valor- D para BAL aisladas de productos cárnicos cocidos

CEPAS	Valor- D (min)
BAL 15a	$D_{75^{\circ}\text{C}} = 4.00$
BAL 22	$D_{75^{\circ}\text{C}} = 3.84$
BAL 12	$D_{75^{\circ}\text{C}} = 3.38$
BAL 11	$D_{75^{\circ}\text{C}} = 1.02$
BAL 10	$D_{72^{\circ}\text{C}} = 0.65$
BAL 21	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 3.73$
BAL 15c	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 3.49$
BAL 18	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 3.46$
BAL 17	$D_{70^{\circ}\text{C}} = 0.73$
BAL 15L	$D_{67^{\circ}\text{C}} = 2.94$

Los valores D encontrados en este estudio son más altos que los reportados para BAL termotolerantes aisladas de heces de pollo en Tailandia, para las cuales la temperatura máxima permisible de crecimiento en caldo MRS fue de 50°C (Niamsup y col., 2003). Sin embargo, esos valores D son menores que los valores reportados para cepas de BAL aisladas de heces de pollo en Senegal, que obtuvieron con valores $D_{80^{\circ}\text{C}}$ y $D_{90^{\circ}\text{C}} = 2.5$ min, pero todavía ligeramente

superiores que los valores reportados por Sow y col. (2005) para células vegetativas ($D_{70^{\circ}\text{C}} = 10\text{-}15\text{ s}$).

El valor máximo de temperatura observado en las BAL termotolerantes fue de 75°C , la cual está cerca de la temperatura interna de cocción utilizada para este tipo de producto cárnico. Las BAL deteriorantes son sensibles al calor, experimentando la reducción de la población a 57°C en menos de 1 min (Franz y von Holy, 1996). En contraste, las BAL homofermentativas son capaces de sobrevivir a cambios físicos (temperaturas bajas y altas) y químicos (alta acidificación, inanición, estrés oxidativo y osmótico) en el medio ambiente a diferentes etapas del ciclo de vida (manipulación, fermentación y su posterior almacenamiento en productos alimenticios), y al desarrollo de numerosos mecanismos de resistencia al estrés. La respuesta bacteriana al choque de calentamiento durante el proceso térmico se caracteriza por el incremento de la expresión de varias proteínas del choque térmico que luego funcionan como chaperonas, así como proteasas específicas. La inducción de estas proteínas a temperaturas subletales aumenta la viabilidad bacteriana durante posteriores episodios de estrés (Geis, 2007). En productos cárnicos cocidos y empaquetados al vacío, las BAL homofermentativas son generalmente consideradas microflora no deteriorante. Las cepas de BAL aisladas son claramente homofermentativas y termotolerantes, lo que significa que pueden sobrevivir al tratamiento térmico del proceso de manufactura de embutidos comerciales, y son además cultivos iniciadores potenciales que pueden convertirse

en la flora dominante en productos cárnicos durante el almacenamiento, proporcionando así una función bioprotectora.

13.3 Identificación Fenotípica y Genotípica de Bacterias Lácticas Termotolerantes

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en la identificación fenotípica y genotípica de las bacterias lácticas termotolerantes. Utilizando el sistema API (perfil de fermentación de carbohidratos) nos dan resultados con un 99.9 % de identificación. Las cepas identificadas fueron: la cepa 15a como *Lactobacillus brevis*, cepas 10a, 15L y 22 como *Lactobacillus plantarum* y cepas 11, 12, 21, 15c y 17 como *Pediococcus pentosaceus*. También produjo un 95.5 % de probabilidad en la identificación de la cepa 18 como *Lactobacillus plantarum*. Los resultados obtenidos por la identificación con el método molecular del gen ARNr 16S produjeron género y especie diferentes del perfil de fermentación de carbohidratos. Estos análisis demuestran que las cepas 10a y 18 fueron identificadas como *Enterococcus faecium*, las cepas 11, 12, 15a, 15L y 22 como *Pediococcus pentosaceus*, las cepas 15c y 17 son *Lactobacillus plantarum* y la cepa 21 es *Aerococcus viridans*. Ambos métodos coincidieron sólo en la identificación de las cepas 11 y 12 como *Pediococcus pentosaceus*.

Tabla 10 Identificación de BAL termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos con sistema API 50 CH y comparación secuencias del gen ARNr 16S.

CEPAS	API 50CH	% de identificación	ARNr 16S	% de identificación
BALS 10a	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0
BALS 11	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.0
BALS 12	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.4	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.0
BALS 15a	<i>Lactobacillus brevis</i>	99.9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.0
BALS 15c	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
BALS 15L	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.0
BALS 17	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.9	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.0
BALS 18	<i>Lactobacillus plantarum</i>	95.5	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0
BALS 21	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	99.9	<i>Aerococcus viridans</i>	99.0
BALS 22	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99.9	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97.0

Cinco cepas fueron asignadas al género *Lactobacillus* o *Pediococcus* por una de las dos técnicas: las cepas 15c, 15L, 17 y 22 fueron identificadas como *Lactobacillus plantarum* o *Pediococcus pentosaceus*, y la cepa 15a como *Lactobacillus brevis* o *Pediococcus pentosaceus*. Estas diferencias probablemente ocurren porque los agrupamientos filogenéticos, para la mayoría de los géneros en el grupo de bacterias lácticas, particularmente *Lactobacillus* y *Pediococcus*, no corresponden con su actual clasificación basada en características fenotípicas, tal como morfología de las células y patrones de fermentación de carbohidratos (Axelsson,

2004). La fisiología basada en agrupamientos de algunos géneros de BAL no está de acuerdo con la relación filogenética, por ejemplo, el género *Lactobacillus* está entremezclado con cepas de *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Stackebrandt y Teuber, 1998). Los datos de la secuencia ARNr 16S confirman que *Lactobacillus* y *Pediococcus* son filogenéticamente cercanos. Estos resultados son similares a los reportados por Collins y col. (1991) por los datos de secuencia ARNr 16S para 55 especies de *Lactobacillus*. Ellos observaron tres agrupaciones filogenéticamente distintas, de los cuales el segundo (designado como un grupo *Lactobacillus casei*) contiene 5 especies de *Pediococcus* y 32 cepas de *Lactobacillus spp.* Claramente, los datos de la secuencia ARNr 16S para *Pediococcus* y *Lactobacillus* indican que el género taxonómico basado en propiedades fenotípicas tal como morfología celular y tipo de fermentación muy a menudo no corresponden con su ramas filogenéticos (Holzapfel y col., 2001).

La cepa 21 fue identificada como *Pediococcus pentosaceus* (perfil de fermentación de carbohidratos) y como *Aerococcus viridans* (ARNr 16S), esto no resulta sorprendente ya que *Aerococcus*, *Pediococcus* y *Tetragenococcus* constituyen las BAL en forma de tétradas. Es más, algunos cepas de *Aerococcus* y *Pediococcus* se han transferido desde un género a otro debido a su proximidad filogenética (Collins y col., 1990; Axelsson, 2004).

Las cepas 10a y 18 fueron identificadas como *Enterococcus faecium* con el método molecular ARNr 16S y *Lactobacillus plantarum* en el perfil de fermentación de carbohidratos.

Esto es interesante porque, debido a la similitud morfológica, el género *Carnobacterium* es indistinguible de *Lactobacillus* usando una identificación fenotípica (Axelsson, 2004). La identificación presuntiva de estas cepas de BAL pueden ser un falso positivo para *Lactobacillus plantarum*, cuando son actualmente probables cepas de *Carnobacterium*. Sin embargo, muchos investigadores citan que *Carnobacterium* es un grupo filogenéticamente muy cercano al género *Enterococcus* (Collins y col., 1989; Stiles y Holzapfel, 1997; Axelsson, 2004) identificados con el gen ARNr 16S. El proceso de calentamiento en carnes puede conferir una ventaja selectiva para las cepas de *Enterococcus*, se sabe que son una de las más termotolerantes de las bacterias no esporuladas. La sobrevivencia de *Enterococcus* en productos cárnicos fermentados puede contribuir a la fermentación, resultando en la producción de enterocinas con actividad antimicrobiana contra patógenos y microorganismos deteriorantes (Franz y Holzapfel, 2004). Las cepas de *Enterococcus* son también usadas como probióticos (Franz y col., 1999).

14 CONCLUSIONES

Al realizar la identificación de las cepas aisladas, se encontró que la identificación fenotípica no correspondió en algunos casos con la genotípica, lo cual puede deberse a la proximidad filogenética o bien a que las bacterias que se aislaron no estén incluidas en las bases de datos del sistema API (Harwood y col. 2004).

La termotolerancia de algunas BAL es importante para que puedan ser utilizadas como cultivos bioprotectores en productos cárnicos cocidos. Al respecto, las diez cepas de BAL toleraron temperaturas de 70 °C por 30 min.

Estas cepas identificadas genotípicamente y caracterizadas bioquímicamente forman parte de la microbiota natural de carnes y de productos cárnicos. Las diez cepas de BAL termotolerantes identificadas son homofermentativas según muestran los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas. De este modo, podrían ser flora dominante en embutidos cocidos y podrían tener aplicaciones potenciales como cultivos iniciadores bioprotectores en productos cárnicos cocidos.

CAPITULO III: PRODUCCIÓN DE METABOLITOS DE BACTERIAS LACTICAS TERMOTOLERANTES Y ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

15 OBJETIVO

Conocer la producción de los metabolitos principales de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.

16 PROLEGÓMENO

Las bacterias lácticas son un grupo fisiológicamente diverso de organismos, el cual es descrito como Gram positivo, cocos o bacilos no esporulados, con ácido láctico como principal producto de la fermentación de carbohidratos (Axelsson, 1998).

Una característica importante para la clasificación de las bacterias lácticas es su patrón de fermentación, que puede ser homo o heterofermentativo, de acuerdo con la ruta metabólica seguida y los productos formados. Las bacterias lácticas homofermentativas producen ácido láctico a partir de azúcares. A diferencia de éstas, las bacterias lácticas heterofermentativas tienen la capacidad de utilizar diferentes rutas metabólicas y producen además de ácido láctico, compuestos como CO₂, ácido acético, acetaldehído, diacetilo y etanol (Sharpe y Pettipher, 1983). La producción de ácido láctico y acético por las bacterias lácticas se excreta al exterior y contribuyen al desarrollo del sabor, aroma y textura de los alimentos, además de proporcionar estabilidad inhibiendo tanto a microorganismos patógenos como a microorganismos causantes del deterioro (Requena y Peláez, 1995).

Existen diversos estudios sobre la aplicación de bacterias lácticas como conservadores de alimentos, los cuales están enfocados hacia el aislamiento de bacterias lácticas capaces de producir compuestos antimicrobianos como ácidos orgánicos y bacteriocinas (Hugas y col., 1995).

Stiles (1996) reporta que existen una serie de características que deben reunir las bacterias lácticas para aplicarlas en la conservación de carne. Las mejores candidatas deben provenir de la flora nativa de diversos sustratos alimentarios. Sin embargo, en carnes para evitar cambios negativos en algunas propiedades sensoriales como textura, color, sabor y jugosidad, se recomienda que las bacterias lácticas empleadas tengan un patrón de fermentación homofermentativo para evitar la producción ácido acético y CO₂ (Huss y col., 1995), porque la formación de CO₂ en los embutidos lleva a la formación de agujeros de diferentes tamaños en el producto. Además la producción de ácido acético puede causar un sabor picante en el producto cárnico (Salim y Mayo, 2007).

El efecto inhibitorio de los ácidos orgánicos esta relacionado directamente con la estructura no disociada de la molécula, siendo este capaz de difundirse a través de la membrana celular y disociarse en su interior para provocar la muerte de la célula (Brus y Coote, 1999).

17 METODOLOGÍA

17.1 Metodología General

Se utilizaron 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes aisladas e identificadas previamente, estas fueron: 5 cepas de *Pediococcus pentosaceus*, 2 cepas de *Lactobacillus plantarum*, 1 cepa de *Aerococcus viridans* y 2 de *Enterococcus faecium*. Se determinó la actividad antagónica de las 10 cepas utilizando como cepas sensibles 7 microorganismos deteriorantes: *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Brochothrix thermosphacta*, *Alteromonas putrefaciens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas fluorescens*, y como patógenos: *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* Como algunas bacterias lácticas pueden ser deteriorantes se probó la actividad antagónica entre ellas mismas. La producción de ácido láctico se determinó mediante la acidez total titulable y la producción de ácido acético mediante cromatografía de gases.

17.1.1 Actividad Antagónica

17.1.1.1 Preparación de la cepa sensible

Se utilizaron siete cepas deteriorantes: *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Brochothrix thermosphacta*, *Alteromonas putrefaciens*, *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas fluorescens*; 3 cepas patógenas: *Listeria innocua*, *Escherichia coli* y *Salmonella sp.* y las diez cepas de BAL-T: *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12),

Pediococcus pentosaceus (15L), *Aerococcus viridans* (21), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17), *Enterococcus faecium* (18) y *Pediococcus pentosaceus* (15a). Esta técnica se realizó para ver la actividad antagónica de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes. Se inocularon sucesivamente en caldo nutritivo, caldo biotriptasa o caldo MRS (Difco, Becton Dickinson and Co., Sparks, Maryland, E.U.) según la bacteria utilizada se incubaron por 8, 18 y 24 h a 35 °C +/- 2 °C, transcurrido este tiempo, se tomaron 70 µL de la suspensión de células la cual se inoculó en 10 mL de agar nutritivo blando (0.8 % agar bacteriológico).

17.1.1.2 Preparación de la cepa productora

Las diez bacterias lácticas termotolerantes previamente identificadas: *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Aerococcus viridans* (21), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17), *Enterococcus faecium* (18), *Pediococcus pentosaceus* (15a). Se inocularon en medio MRS y se incubaron por 8 y 18 horas a 35 °C +/- 2 °C, transcurrido este tiempo, las células se separaron por centrifugación en una centrífuga Beckman (Palo Alto, California, E.U.) a 12000 g durante 10 min a 4 °C, posteriormente el pH del sobrenadante se ajustó a 5.8-5.9 con NaOH 1.0 N, en un potenciómetro pH ISE Meter 50 Beckman (Palo Alto, California, E.U.). Se esterilizó el sobrenadante por

filtración a través de una membrana de tipo GS con un tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore, N°. Cat. GSWP 013 00 Anderson, California, USA).

17.1.1.3 Actividad antagónica

Para evaluar la actividad antagónica, se empleó el método de difusión en placas de agar descrito por Bhunia y col. (1988). En esta técnica la evaluación de la actividad antimicrobiana se fundamenta en la difusión del metabolito en un medio de cultivo sólido que contiene la cepa sensible (Tramer y Fowler, 1964). La difusión en agar se empleó para evaluar la actividad antagónica con diferentes microorganismos inclusive entre ellas mismas.

Sobre 10 mL de agar nutritivo, TBS o MRS según la cepa utilizada, se colocó una sobrecapa de 10 mL de agar bacteriológico suave (0.8 %) inoculado con la cepa sensible. Después las placas se almacenaron a 4 °C para permitir la solidificación del agar; posteriormente se realizaron los pozos con la parte superior de una pipeta pasteur. Cada pozo se llenó con 30 μL del extracto libre de células (cepa productora). Las placas se colocaron a temperatura ambiente durante 30 min con el fin de permitir la difusión del extracto y después se incubaron a 35 °C $\pm$ 2 °C durante 24 h. Transcurrido este tiempo, la actividad antagónica se determinó observando la aparición del halo de inhibición de crecimiento.

17.2 Determinación de Ácidos Orgánicos

17.2.1 Acidez Total Titulable (ATT) (Producción de ácido láctico)

17.2.1.1 Inoculación de carne de cerdo

Esta determinación se realizó por el método descrito por Guerrero y Arteaga, (1990). Se inoculó cada una de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes en 7.5 mL de caldo MRS a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=600$ nm) de 1.0 (concentración aproximada de 10^8 ufc / mL). Posteriormente se pesaron 150 g de lomo de cerdo y se inocularon por inmersión en la suspensión de bacterias lácticas (5 % de inóculo) se dejaron reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente la carne se escurrió y se dividió en porciones de 20 g aproximadamente los cuales se empacaron al vacío en una empacadora VacMaster modelo SVP 15 (México, Distrito Federal) las muestras se almacenaron a 10 +/- 2 °C durante 15 días, la carne sin inocular constituyó el testigo. A los días 1, 3, 6, 8, 10, 13 y 15 se realizaron el análisis de acidez total titulable.

17.2.1.2 Preparación de la muestra

Se homogeneizaron 20 g de cada muestra de lomo de cerdo con 200 mL de agua destilada durante 1 min en una licuadora convencional, la mezcla obtenida se filtró a través de una manta de cielo. El filtrado se aforó a 250 mL con agua destilada. A 25 mL de esta solución se le adicionaron 75 mL de agua destilada y se realizó una

titulación con NaOH al 0.1N, usando fenolftaleína como indicador. Esta determinación se realizó por triplicado. Finalmente, la ATT se reportó como % de ácido láctico empleando la Ecuación 2

Ecuación 2 Porcentaje de ácido láctico

$$\% \text{ ácido láctico} = \frac{(V_{\text{NaOH}})(N_{\text{NaOH}})(\text{mequi. ácido láctico})(f)}{\text{Peso de la muestra}} \times 100$$

Donde:

V_{NaOH} = Volumen de la solución de NaOH

N = Normalidad

f = Factor de dilución = mL aforado (250 mL) / alícuota (25 mL)

mequi. = miliequivalentes de ácido láctico = PM (ácido láctico) / 1000

17.2.2 Cuantificación de ácido acético (Cromatografía de Gases)

17.2.2.1 Inoculación de la carne de cerdo

Se inoculó cada una de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=600$ nm) de 1.0 (concentración aproximada de 10^8 ufc / mL), posteriormente se pesaron 20 g de lomo de cerdo y se inocularon por inmersión en la suspensión de bacterias (5 % de inóculo) se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Carne sin inóculo constituyó el control. Se empacaron las muestras al

vacío y se almacenaron a 10 ± 2 °C durante 8 días, los análisis se realizaron después de 1 y 8 días de incubación.

17.2.2.2 Preparación de la muestra

Las muestras de lomo de cerdo fermentado se analizaron por duplicado a los 1 y 8 días de almacenamiento. Para la extracción, se pesaron 5 g de muestra y se homogeneizaron durante 1 min con 20 mL de agua destilada en una licuadora convencional. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 8000 g por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró por medio de un filtro de tipo de membrana de teflón con un tamaño de poro de 0.45 μm (Schleicher y Schuell No. Cat. LLFZ495 Dassel, Germany) y se aforó a 25 mL. Se ocuparon volúmenes de 0.5 μL para inyectar al cromatógrafo de gases para realizar la cuantificación de ácido acético.

17.2.2.3 Condiciones de cromatografía

La cuantificación de ácido acético se realizó en un sistema de cromatografía de gases Hewlett Packard Modelo 5890 (Palo alto, C. A. USA), equipado con un detector de ionización de flama y una columna AT-1000. En la Tabla 11 se muestran las condiciones de corrida del cromatógrafo.

Tabla 11 Condiciones cromatográficas para el análisis de ácido acético

Parámetro	Valor
Temperatura	120 °C
Temperatura del inyector	130 °C
Temperatura del detector	150 °C
Flujo	0.5 µL
Tiempo de corrida	8 min
Presión	

Para determinar la concentración de ácido acético presente en las muestras, se elaboró una curva patrón a partir de ácido acético (0-80 µg / mL).

18 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

18.1 Actividad Antagónica

Las bacterias lácticas aisladas de carnes y de productos cárnicos son probablemente los mejores candidatos para mejorar la calidad microbiológica de estos alimentos, debido a que estos microorganismos se han adaptado a las condiciones en este ambiente y deberían ser más competitivas que bacterias lácticas de otras fuentes.

En la Tabla 12 se muestra la actividad antagónica contra microorganismos deteriorantes de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes; los resultados muestran que las bacterias lácticas utilizadas producen actividad antagónica contra *Pseudomonas fragi* y *Pseudomonas fluorescens*, pero no la presentan con las cepas restantes: *Enterococcus sp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Brochothrix thermosphacta* y *Alteromonas putrefaciens*, bajo las condiciones de este estudio. Esto es importante ya que aunque la microflora inicial de la carne es muy variada, la mayoría de los microorganismos que alteran la carne fresca refrigerada son bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Moraxella*, estando presentes también especies anaerobias facultativas como enterobacterias, *Aeromonas*, *Alteromonas putrefaciens* y microorganismos Gram positivos como *Lactobacillus* y *Brochothrix thermosphacta* (Buchanan y Palumbo, 1985).

Con estos resultados se corrobora que se pueden utilizar estas bacterias lácticas como un método de conservación para aumentar la vida de anaquel de la carne y productos cárnicos.

Tabla 12 Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre microorganismos deteriorantes.

Cepa Productora	11	12	15L	21	22	10a	15 ^a	15c	17	18
Cepa Sensible										
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brochothrix thermosphacta</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alteromonas putrefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas fragi</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ Si hay actividad antagónica - No hay actividad antagónica

En la Tabla 13 se muestra la actividad antagónica de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes; en el caso de la cepa *Pediococcus pentosaceus* (11) y *Lactobacillus plantarum* (15c) se observa actividad antagónica entre ellas. Las cepas *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Aerococcus viridans* (21), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Lactobacillus plantarum* (17), *Enterococcus faecium* (18) y *Pediococcus pentosaceus* (15a) no presentan actividad antagónica entre ellas mismas bajo las condiciones de este estudio.

Tabla 13 Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre ellas mismas.

Cepa Productora	11	12	15L	21	22	10a	15a	15c	17	18
Cepa Sensible										
<i>P. pentosaceus</i> (11)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (12)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (15L)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>A. viridans</i> (21)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (22)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (10a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i> (15a)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> (15c)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i> (17)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecium</i> (18)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Si hay actividad antagónica - No hay actividad antagónica

La finalidad de este estudio fue conocer el efecto inhibitorio entre las mismas bacterias lácticas, ya que algunas de ellas pueden ser deteriorantes. Las bacterias lácticas producen metabolitos secundarios que pueden inhibir cepas de algunas especies cercanamente relacionadas a la cepa productora. Schillinger y Lucke (1989) encuentran que *L. sake* produce una bacteriocina que ellos denominaron sakacina A, la cual solo inhibía otras bacterias lácticas. *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus* y *Lactobacillus plantarum* producen también bacteriocinas inhibitoras solo de otras bacterias lácticas (Daeschel y col., 1983, citado por Schillinger y Lucke, 1989). En estudios similares, Todorov y col. (1999) reportan que *Lactobacillus plantarum* ST31 produce una sustancia antimicrobiana

(*plantaricina*) que inhibe a cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y algunos tóxico-patogénicas incluyendo *S. aureus*.

En la Tabla 14 se muestra la actividad antagónica contra microorganismos patógenos (*E. coli*, *Salmonella* y *Listeria innocua*) de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes, ninguna tuvo efecto sobre los microorganismos utilizados bajo las condiciones de este estudio.

Tabla 14 Actividad antagónica de bacterias lácticas aisladas de productos cárnicos cocidos sobre microorganismos patógenos.

Cepa Productora	11	12	15L	21	22	10a	15a	15c	17	18
Cepa Sensible										
<i>Listeria innocua</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Si hay actividad antagónica - No hay actividad antagónica

Algunos autores han reportado que existen varios factores que influyen en la actividad antagónica de las bacterias como el pH, tipo de cepa, composición del medio, tiempo de incubación y temperatura óptima (Yang y Ray, 1994). Silva y col. (1987) obtuvieron baja actividad antagónica contra *Staphylococcus aureus*, utilizando cepas de *Lactobacillus sakei* y *Lactobacillus salivarius* pero no demostraron actividad contra *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*.

Lemus y col. (1991) estudiaron 10 cepas de *Lactobacillus* productoras de bacteriocinas aisladas de cortes de carne; se probó su actividad inhibitoria contra 4

cepas de *L. monocytogenes*, 2 cepas de *Aeromonas hydrophila* y 2 cepas de *S. aureus*. Ellos encontraron que 8 cepas de *Lactobacillus* tuvieron actividad inhibitoria contra todas las cepas utilizadas como cepas indicadoras y por lo tanto, concluyeron que el uso de *Lactobacillus* productores de bacteriocinas puede constituir un medio natural de conservación.

Helander y col. (1997) reportaron inhibición de microorganismos gram negativos pero ellos atribuyeron esta inhibición a la producción de ácidos orgánicos y no a la producción de bacteriocinas.

Ferreira y col. (2003) aislaron 484 bacterias lácticas de salami italiano (dentro de las cuales se encontraron especies de *Leuconostoc mesenteroides*, subsp. *cremoris*, *Lactobacillus bif fermentans* y *Lactobacillus alimentarius*), y determinaron la actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* y *Escherichia coli* ATCC25922; los resultados que obtuvieron mostraron que 115 cepas de BAL aisladas de salami italiano inhibieron al menos dos de los microorganismos patógenos ya mencionados, teniendo mayor inhibición contra *Listeria monocytogenes*. Ellos concluyeron que el uso de estos microorganismos como cultivos iniciadores en la elaboración de embutidos fermentados puede incrementar la seguridad para el consumo de estos productos.

18.2 Determinación de Ácidos Orgánicos (láctico y acético)

La fermentación láctica genera sabores y olores característicos, algunos debido a la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta como ácido láctico, acético, propiónico, etc. (Lucke, 2000), los cuales en muchas ocasiones son muy apreciados en la elaboración de productos cárnicos. Sin embargo, la producción de tales compuestos podría tener algún impacto sobre el sabor y el olor de la carne y de productos cárnicos y por lo tanto, afectaría la aceptación por parte del consumidor.

18.2.1 Producción de ácido láctico

Los principales mecanismos por los cuales las bacterias lácticas reprimen a sus competidores son por la formación de ácido láctico, ácido acético y bacteriocinas (Helander y col., 1997).

Muchos ácidos orgánicos y sus sales tienen la capacidad de inhibir la proliferación de microorganismos deteriorantes y patógenos en los alimentos. Las sales de los ácidos orgánicos de cadena corta han sido clasificadas en la lista de GRAS para usos como emulsificante, potenciador de sabor y agente de control de pH en algunos alimentos (De Koos, 1992).

En las Figuras 3 a la 12 se muestran los resultados de la producción de ácido láctico de las cepas *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Aerococcus viridans* (21), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (15a),

Lactobacillus plantarum (15c), *Lactobacillus plantarum* (17) y *Enterococcus faecium* (18); todas las cepas produjeron niveles de ácido láctico mayor que el testigo (muestra de carne sin inóculo sometida a las mismas condiciones que todas las muestras) durante los 15 días de almacenamiento, produciendo la concentración más alta entre los días 8 y 10 en todas las cepas de BAL-T. Esto se debe a su carácter homofermentativo; teniendo como principal producto de la fermentación, ácido láctico (González y col., 2000).

Por otra parte, la concentración de ácido láctico producida en el testigo, se debió a la flora nativa de BAL de la carne, en las que se incluyen especies: *Carnobacterium piscicola*, *Carnobacterium divergens*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc gelidum* y *Leuconostoc carnosum* (Hugas, 1998).

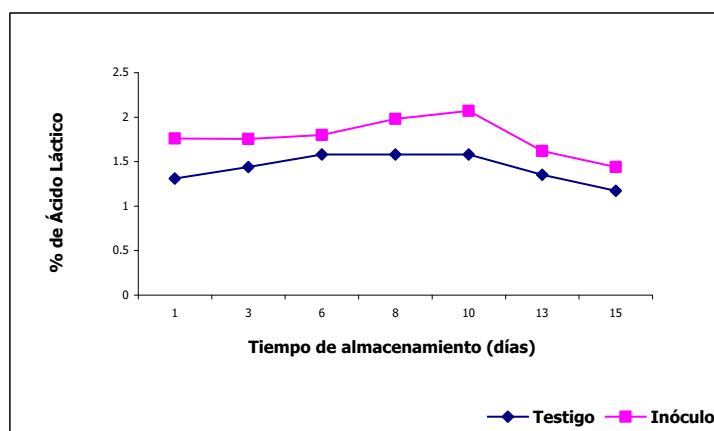


Figura 3 Producción de ácido láctico por *Pediococcus pentosaceus* (11) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

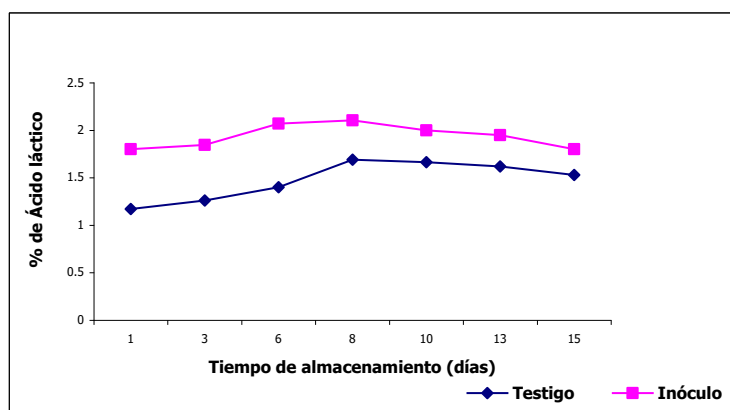


Figura 4 Producción de ácido láctico por *Pediococcus pentosaceus* (12) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

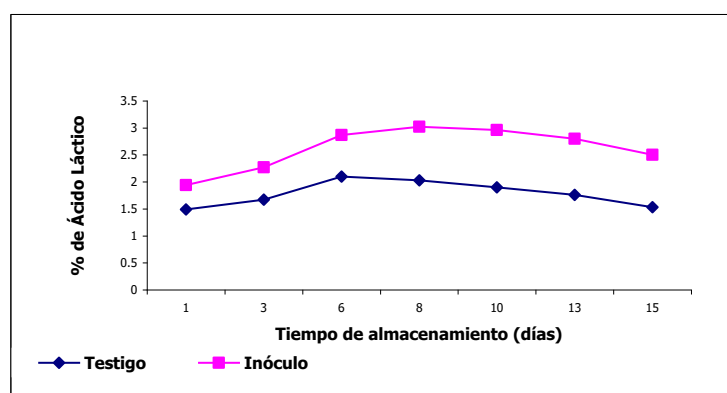


Figura 5 Producción de ácido láctico por *Pediococcus pentosaceus* (15L) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

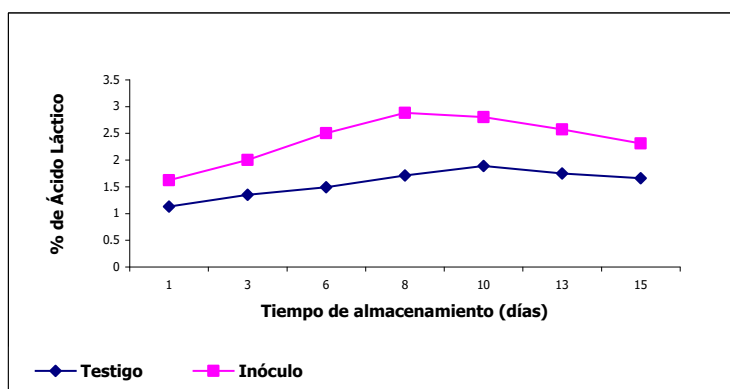


Figura 6 Producción de ácido láctico por *Aerococcus viridans* (21) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

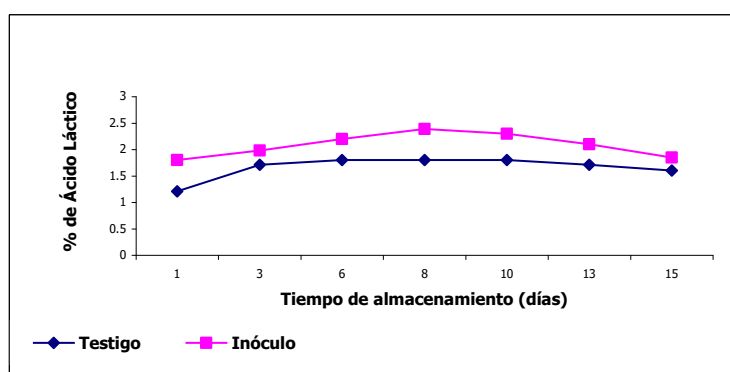


Figura 7 Producción de ácido láctico por *Pediococcus pentosaceus* (22) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

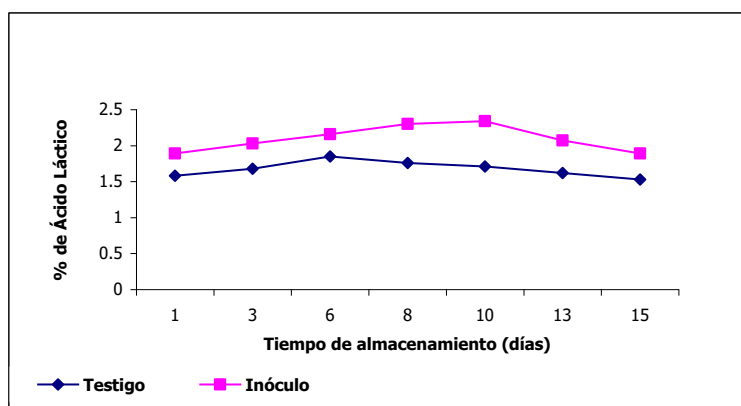


Figura 8 Producción de ácido láctico por *Enterococcus faecium* (10a) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

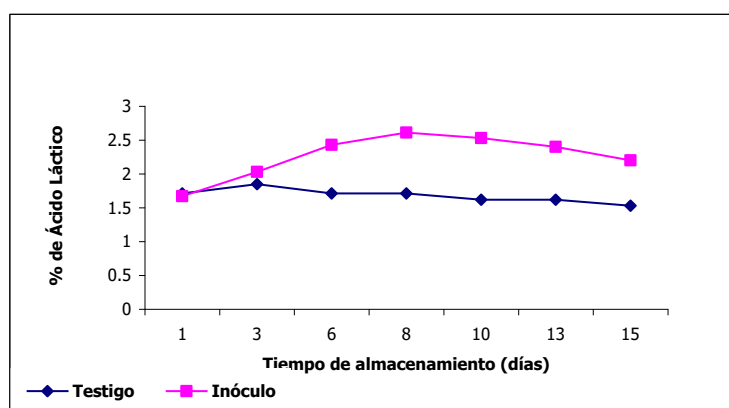


Figura 9 Producción de ácido láctico por *Pediococcus pentosaceus* (15a) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

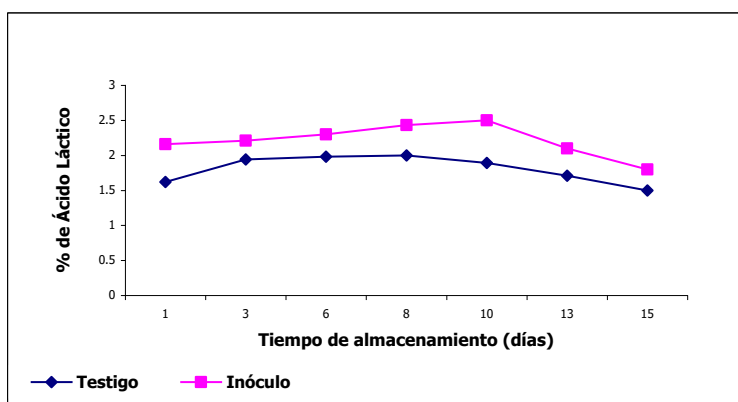


Figura 10 Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* (15c) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

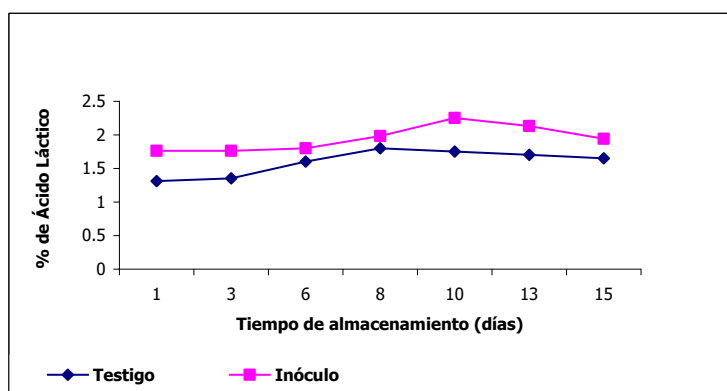


Figura 11 Producción de ácido láctico por *Lactobacillus plantarum* (17) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

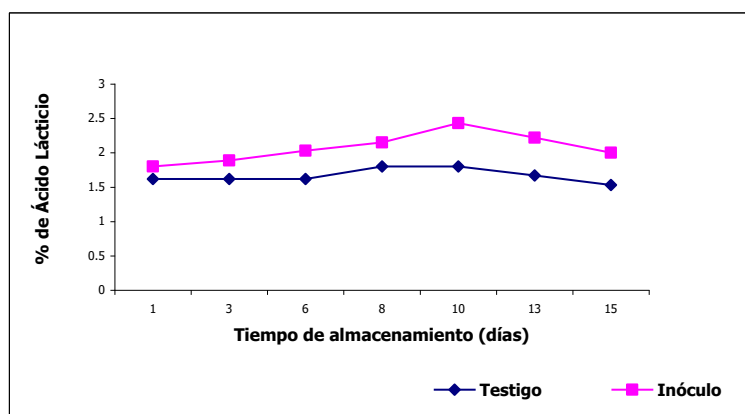


Figura 12 Producción de ácido láctico por *Enterococcus faecium* (18) en carne de cerdo almacenada durante 15 días a 4 °C.

Borch y Agerhem en 1992, obtuvieron un aumento en la producción de ácido láctico aproximadamente entre 80 y 150 mg /100 g de carne durante el almacenamiento, usando como inóculo *Lactobacillus sp.* 93 SMRICC. Este comportamiento se debió a que el empleo de vacío, favoreció las condiciones anaerobias ideales para el desarrollo de cultivos bioprotectores, así como la producción de sus metabolitos, entre ellos el ácido láctico.

Minor y col. (2002) evaluaron la inoculación de *S. carnosus* y *L. alimentarius* para la conservación de carne fresca de cerdo. La carne se almacenó a 4 °C durante 96 h, se determinó la cantidad de ácido láctico por cromatografía de gases, sus resultados mostraron que la producción de ácido láctico se incrementa constantemente hasta las 48 h de almacenamiento, con un valor de 4.25 y 4.11

mg / mL respectivamente, para posteriormente reducirse a valores de 2.88 y 2.78 mg / mL, ellos concluyen que pueden ser empleadas en la elaboración de embutidos para mejorar la calidad microbiológica de la carne de cerdo teniendo mayor relevancia que en color y textura.

18.2.2 Cuantificación de ácido acético por cromatografía de gases

En el primer día de almacenamiento, el control (carne de cerdo sin inocular) presentó una concentración de ácido acético de 2.15 μg / mL, siendo éste el valor mínimo (Tabla 15). En el resto de las muestras las concentraciones se multiplicaron desde cerca de 5 hasta más de 15 veces el valor del control.

En el octavo día de almacenamiento, el comportamiento de 4 de las cepas (*Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Aerococcus viridans* (21) y *Pediococcus pentosaceus* (15a)), fue similar al del control con una disminución de la concentración de ácido acético, mientras que las otras seis (*Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Enterococcus faecium* (10a), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17) y *Enterococcus faecium* (18)) incrementaron la concentración del mismo como se puede observar en la misma Tabla 15.

Debido a que la caracterización bioquímica señala un carácter homofermentativo de las cepas estudiadas en este trabajo (Ramírez-Chavarín, 2005), la producción de ácido acético se puede explicar por la presencia de BAL nativas y otros microorganismos en la carne, capaces de crecer en condiciones anaeróbicas

(Jackson y col., 1997). Otra explicación, es que cuando se lleva acabo la fermentación homoláctica se puede producir una mezcla de ácidos orgánicos, debido a una concentración de glucosa limitante, a un incremento de pH y temperatura, o la fermentación de azúcares diferentes a la glucosa. En estos casos, la diferencia radica en el metabolismo del piruvato, el cual además de producir ácido láctico produce otros ácidos orgánicos como acético (Hofvendahl y Hahn-Hägerdal, 2000). Generalmente las bacteria lácticas que producen más ácido acético (aproximadamente entre 1-2 %) son las heterofermentativas, en las que se incluyen las especies: *Lactobacillus* (*L. brevis* y *L. buchnerii*) y *Leuconostoc* (*L. mesenteroides*, *L. dextranicum* y *L. cremoris*). (Larpen, 1995).

Tabla 15 Producción de ácido acético por las bacterias lácticas termotolerantes en un sistema de carne de cerdo almacenado 1 y 8 días a 4 °C.

Tiempo de almacenamiento a 4 °C	día 1	día 8
Muestras	Concentración de ácido acético (µg/mL)	
control	2.15	1.43
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (11)	38.32	25.04
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (12)	12.63	24.50
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (15L)	20.99	16.54
<i>Aerococcus viridans</i> (21)	20.62	15.69
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (22)	14.04	16.54
<i>Enterococcus faecium</i> (10a)	17.97	30.87
<i>Pediococcus pentosaceus</i> (15a)	27.82	17.12
<i>Lactobacillus plantarum</i> (15c)	10.26	29.12
<i>Lactobacillus plantarum</i> (17)	13.38	17.12
<i>Enterococcus faecium</i> (18)	27.09	28.72

En otros estudios Quintero (2001) determinó la cantidad de ácido acético utilizando cromatografía líquida de alta presión en carne de pollo inoculada con *L. lactis* subs.

lactis ATCC 11454 y *S. carnosus* MC-1-0204 almacenada durante 8 días. Se observó que la concentración de ácido acético se incrementa durante el tiempo de almacenamiento independientemente del inóculo, obteniendo valores de 13.65, 29.51, 102.88 mg / 100 g de carne. En nuestro caso la producción de ácido acético fue mínima comparada con los valores que obtuvo Quintero (2001).

19 CONCLUSIONES

Las bacterias lácticas termotolerantes solo produjeron actividad antagónica en contra del género *Pseudomonas*, bajo las condiciones utilizadas en este estudio. Sin embargo, una de las bacterias lácticas produjo actividad antagónica contra otra bacteria láctica. Todas ellas tuvieron una buena producción de ácido láctico debido a su carácter homofermentativo, pero la producción de ácido acético fue menor. Estos resultados indican que estas bacterias podrían ser aplicadas en productos cárnicos, debido a que tienen efecto positivo de inhibición sobre el género *Pseudomonas* que es predominante en la carne y productos cárnicos en refrigeración, ocasionando deterioro de la misma.

CAPITULO IV: EVALUACIÓN DE BACTERIAS LÁCTICAS TERMOTOLERANTES COMO PROBIÓTICOS.

20 OBJETIVO

Evaluar algunas características para uso como probiótico de bacterias lácticas termotolerantes en productos cárnicos cocidos.

21 PROLEGÓMENO

La relación entre alimentos y salud se ha investigado durante muchos años. Estos estudios han permitido el desarrollo del concepto de un alimento funcional como un alimento o ingrediente alimentario con efecto positivo sobre la salud, más allá de su valor nutritivo (Huggett y Verschuren, 1996). En años más recientes, la atención se ha dirigido hacia los aditivos alimentarios que pueden ejercer un efecto positivo en la microflora del tracto gastrointestinal humano y, por lo tanto, hacia los probióticos (Ziemer y Gibson, 1998). Los probióticos, se han definido como microorganismos vivos añadidos a un alimento que ejercen un efecto beneficioso a la salud humana mediante la mejora del balance de la microflora intestinal (Fuller, 1989). Se ha visto que poseen varias propiedades tales como: acción antagónica, producción de sustancias antimicrobianas y modulación de la respuesta inmune (Dunne y col., 1999). Para seleccionar una cepa como probiótico se requiere que se cumpla con ciertas características fisiológicas, dentro de las principales se encuentran (Tomasik y Tomasik, 2003): Supervivencia a través del tracto

gastrointestinal, tolerancia a pH bajo, tolerancia a bilis la cual se encuentra en forma de ácido glicocólico o taurocólico y desoxicolato de sodio (Madigan y col., 2006) y la adhesión al mucus intestinal y a células epiteliales intestinales. Se han propuesto dos posibles mecanismos que producen efectos benéficos de las bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal, estos son: a) la producción de sustancias antimicrobianas tales como ácido láctico y bacteriocinas, y b) la adherencia a la mucosa, co-agregación y autoagregación para formar una barrera que impida la colonización por patógenos (Ehrmann y col., 2002).

Muchas propiedades diferentes son usualmente investigadas *in vitro* para determinar si una cepa específica podría ser seleccionada como probiótico, tales como la tolerancia a pH bajos, tolerancia a sales biliares, adhesión a la pared intestinal, por mencionar algunas. Pennacchia y col. (2004) aislaron e identificaron 25 cepas de *Lactobacillus plantarum* de embutidos secos fermentados tradicionales, las cuales fueron capaces de resistir a pH bajo y crecer en condiciones simuladas del ambiente intestinal, asegurando su valor como probióticos. Arihara y col. (1998) encontraron que cepas de *Lactobacillus gasseri* JCM1131 pueden ser aplicadas en carnes fermentadas para aumentar la seguridad de éstos productos debido a su potencial probiótico.

22 METODOLOGÍA

Se emplearon 10 bacterias lácticas termotolerantes previamente identificadas mediante pruebas bioquímicas, fermentación de carbohidratos (Sistema API) e identificación genotípica como: 4 cepas de *Pediococcus pentosaceus*, 3 cepas de *Lactobacillus plantarum*, 2 cepas de *Enterococcus faecium* y 1 cepa de *Aerococcus viridans*. A estas cepas se les realizaron las siguientes pruebas para determinar si reunían ciertas características para poder considerarlas como probióticos: tolerancia a pH ácido, sobrevivencia a jugo gástrico simulado, tolerancia a ácido taurocólico y bilis, coagregación, agregación y adherencia a células epiteliales HEP-2.

22.1 Tolerancia a pH Ácido

Para evaluar la tolerancia de pH bajos, se empleó el método descrito por Ehrmann y col. (2002), el cual se fundamenta en que el pH de los fluidos del estómago es bajo, aproximadamente de 2.0; esto hace que se pueda considerar una barrera de entrada a bacterias que puedan actuar como probióticos en el tracto gastrointestinal (Suskovic y col., 1997).

Se inoculó cada una de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS (De Man y col., 1960) Difco, N° Cat. 288130, (Detroit, Mich., EUA) y se incubó a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h en una incubadora Felisa 133 (Guadalajara Jalisco, México); una vez transcurrido este tiempo se inoculó en un medio de cultivo fresco de MRS y se incubó a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h. Posteriormente

se centrifugó a 5000 g por 10 min a 4 °C en una centrifuga Beckman (Palo Alto, California, E.U.), después la biomasa se lavó dos veces con una solución de amortiguador de fosfatos 1X (PBS= Na_2HPO_4 (10.9 g / L), NaH_2PO_4 (3.2 g / L), NaCl (90 g / L), pH 7.2) estéril, se ajustó el pH a 7.2 y se resuspendió en PBS 1X. Se diluyó cada cepa 1/10 en PBS 1X donde se ajustó a un pH de 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 con un potenciómetro pH ISE Meter 50 Beckman (Palo Alto, California, E.U.). Posteriormente se incubó durante 1, 2 y 4 h. Las bacterias se inocularon en medio MRS y se incubaron en condiciones anaerobias a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h. La sobrevivencia de bacterias se determinó por conteo en placa.

22.2 Sobrevivencia a Jugo Gástrico Simulado

La sobrevivencia de las bacterias en el jugo gástrico depende de su capacidad para tolerar pH bajos. El valor de pH por el HCl excretado en el estómago es de 0.9, pero la presencia de los alimentos hace que éste suba a 2.0 (Erkkila y Petaja, 2000). La metodología utilizada fue la reportada por Beumer y col. (1992). Se inoculó cada una de las 10 cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h hasta alcanzar una D.O de 1.0 a 600 nm (concentración aproximadamente 10^8 ufc / mL); posteriormente se inocularon 10 μL de la suspensión bacteriana en 10 mL de jugo gástrico simulado (2.05 g / L de NaCl, 0.60 g / L de KH_2PO_4 , 0.11 g / L de CaCl_2 , 0.37 g / L de KCl, 0.05 g / L de bilis de porcino, 0.1 g / L de lizosima y 0.0133 g / L de pepsina) a pH 2.0, se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 90 min, se tomaron muestras en periodos de

0, 30, 60 y 90 min., se realizaron diluciones 10^{-1} y 10^{-2} , posteriormente se inocularon 100 μ L en cajas con agar MRS las cuales se incubaron a 35 °C $\pm$ 2 °C durante 48 h. La sobrevivencia se midió por conteo en placas con agar MRS.

22.3 Tolerancia a Ácido Taurocólico y Bilis

Las sales biliares son de gran importancia en la sobrevivencia y crecimiento de las bacterias lácticas en el tracto gastrointestinal, por lo tanto, la resistencia es un prerrequisito para poder ser consideradas como probióticos (Havenaar y col., 1992). El crecimiento en bilis se evaluó utilizando la metodología reportada por Pedersen y col. (2004) y el crecimiento en taurocolato de sodio por la metodología descrita por Ehrmann y col. (2002). En el presente trabajo se utilizaron dos diferentes tipos de sales biliares: extracto de bilis de porcino Sigma, No. Cat. B8631, (St. Louis, USA) y ácido taurocólico Sigma, No. Cat. T4009 (St. Louis, USA) para ver el crecimiento en las dos formas (conjugadas como ác. glicólico y ác. taurocólico y reconjugadas como desoxicolato de sodio) de las sales biliares.

Se inoculó cada una de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS y se incubó a 35 °C $\pm$ 2 °C durante 24 h; una vez transcurrido este tiempo, se inocularon 100 μ L de la suspensión bacteriana en 10 mL de caldo MRS suplementado con 0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 % de extracto de bilis de porcino y en taurocolato de sodio a 7 mmol / L, y se incubó a 35 °C $\pm$ 2 °C durante 7 h, monitoreando el crecimiento cada hora; se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman DU modelo 650 (Palo Alto, California, EUA) a 600 nm.

22.4 Coagregación

A la capacidad de algunas especies de *Lactobacillus* de formar una barrera para prevenir la colonización por patógenos se le llama coagregación (Schachtsiek y col., 2004; Schellenberg y col., 2006).

La coagregación fue realizada de acuerdo con Yuki y col. (2000), con ligeras modificaciones. Se inoculó cada una de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS y se utilizaron las cepas de *E. coli* O139:H26 y *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23, las cuales se sembraron en caldo BT (Caldo Biotriptasa) Bioxon, No. Cat. 141, (Edo. Méx., México), se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h; una vez transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones de la suspensión de las cepas de BAL-T hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=600$ nm) de aproximadamente de 1.0 (correspondiente a 10^8 ufc / mL); y de las cepas de *E. coli* O139:H26 y *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23 hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=600$ nm) de 0.6 (concentración aproximadamente 10^6 ufc / mL); posteriormente la suspensión bacteriana se centrifugó a 7000 g durante 10 min a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1M) y se resuspendieron en el mismo volumen del amortiguador; se ajustó la densidad óptica ($\lambda=600$ nm) a 0.5 células de BAL-T y a 0.5 ($\lambda=600$ nm) células *E. coli* O139:H26 y *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23. Se mezclaron ambas cepas a un volumen total 1:1 y se agitó durante 5 min. Posteriormente se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 4 h, y se midió la absorbancia a 600 nm para la mezcla de

suspensiones bacterianas y para la suspensión de cada una de las cepas (BAL-T, *E. coli* O139:H26 y *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23). El porcentaje de coagregación fue calculado con la Ecuación 3:

Ecuación 3 Coagregación (Handley y col., 1987)

$$\frac{(A_{\text{patógeno}} + A_{\text{BAL}}) / 2 - A_{\text{mezcla}}}{(A_{\text{patógeno}} + A_{\text{BAL}}) / 2} \times 100 \%$$

22.5 Autoagregación

El fenómeno de autoagregación que es la agregación bacteriana entre microorganismos del mismo género, es importante para mantener las poblaciones microbianas en diferentes superficies de la mucosa (Jankovic y col., 2003).

La autoagregación fue realizada de acuerdo con Collado y col. (2007), con ligeras modificaciones. Se inoculó cada una de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes en caldo MRS, se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 24 h; una vez transcurrido este tiempo, se realizaron diluciones hasta alcanzar una densidad óptica ($\lambda=600$ nm) de aproximadamente 1.0 (correspondiente a 10^8 ufc / mL); posteriormente se centrifugó a 3200 g durante 20 min a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1M) y se resuspendieron en el mismo volumen del amortiguador; se ajustó la densidad óptica ($\lambda=600$ nm) a 1.0, se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 2 y 24 h; una vez transcurrido el tiempo de incubación se midió la absorbancia de las BAL-T. El porcentaje de autoagregación fue calculado con la Ecuación 4:

Ecuación 4 Autoagregación (Reniero y col., 1992)

$$1-(A_{\text{tiempo}} / A_{\text{inicial}}) \times 100$$

Donde:

A_{tiempo} = Representa la absorbancia a 600 nm de los diferentes tiempos de incubación (2 y 24 h).

A_{inicial} = Representa la absorbancia a 600 nm antes del periodo de incubación.

22.6 Ensayo de Adherencia a Células HEp-2

Se utilizó la línea celular HEp-2 (células carcinomas de laringe humano) estas células se utilizan normalmente para detectar la capacidad adherente de *E. coli* (Vidal y col., 2007), debido a que es un sistema modelo celular *in Vitro*, de igual forma que la línea celular Caco-2 y HT-29 que han sido extensivamente usadas para evaluar las propiedades adhesivas de cepas probióticas (Tuomola y Salminen, 1998; Blum y col., 1999) *in vitro*. La técnica utilizada fue descrita por Cravioto y col. (1979). Se requirió un frasco de 75 mL para cultivo celular con 20 mL de medio mínimo esencial de Eagle (MEM) Gigco Laboratories, N°. Cat. 410-1700EF (New York, USA) y una monocapa de células HEp-2 al 80 % de confluencia.

22.6.1 Día 1 Obtención de la suspensión bacteriana

Se inoculó por cada cepa, tubos con 3 mL de caldo MRS con D-manosa Sigma, No. Cat. 3458-28-4 (St. Louis, USA) al 1 % y se incubaron a 35 °C +/- 2 °C durante 18 h.

22.6.2 Día 2 Preparación de la placa de propileno de 24 pozos

Se colocaron lentejas de plástico en cada pozo de la placa con una pinza flameada. Se vació el medio MEM del frasco de cultivo de células HEp-2, se adicionó 1 mL de tripsina al frasco para enjuagar y se desechó la tripsina. Nuevamente se adicionó 1 mL de tripsina al frasco con células por 5 min para el desprendimiento de la monocapa. Se adicionaron 29 mL de MEM. Se adicionó 1 mL de la suspensión (2.5×10^5 células / mL) en cada uno de los pozos de la placa. Después de cada 6 pozos llenados se repipeteó la suspensión de células para tener la suspensión homogénea. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % y de humedad 85 % en una incubadora Baxter Scientific Products ultra-tech WJ 301 D, durante 24 h para obtener la monocapa al 90 % de confluencia.

22.6.3 Día 3 Ensayo de Adherencia.

En condiciones de esterilidad se desechó con pipeta Pasteur 1 mL de medio de cada uno de los pozos. Se lavaron las células de los pozos con 1 mL de PBS 1X, se resuspendió 3 veces y se desechó el sobrenadante. Se adicionó 1 mL de PBS 1X. El cultivo bacteriano se centrifugó 15 min a 2000 g, se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 1 mL de PBS 1X. Se mezclaron en un agitador los tubos para disolver el botón celular. En un microtubo estéril de 1 mL se adicionaron 850 µL de MEM (sin suero, sin antibiótico), 100 µL de D-manosa al 10 % (concentración final de 1 %) y 50 µL de la suspensión bacteriana

(concentración final 1.0×10^8 ufc / mL) resuspendida en PBS 1X. Se retiró el PBS 1X de los pozos de la placa con la monocapa celular y se agregó la suspensión bacteriana (1 mL); se incubó a 37 °C durante 3 h en atmósfera CO₂ 5 %. Después de las 3 h de incubación, se realizaron lavados con 1 mL de PBS estéril por triplicado. Sucesivamente se realizó el fijado con metanol concentrado (500 µL) dejándolo 1 min; posteriormente se adicionó 1 mL de colorante Giemsa Merck, (Darmstadt, Alemania) se dejó teñir durante 20 min y por último se lavó 3 veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Después se hizo un deshidratado de las células, tomando con pinzas cada lenteja y pasando 30s en cada una de las siguientes soluciones: acetona, acetona 50 / xileno 50, y xilol 100. Inmediatamente se montaron las lentejas en un portaobjetos con una resina (bálsamo de Canadá), se colocó la lenteja con la monocapa celular hacia arriba y se adicionó una gota de resina sobre cada una de ellas. Se dejó secar durante 24 h. Una vez secas las preparaciones se observaron en un microscopio Zeiss Axiolab (West Germany) y se tomaron fotografías utilizando una cámara HBO 50 integrada en el microscopio. El estudio se realizó por triplicado. La adhesión se observó al microscopio y se anotó positiva si más de 10 bacterias lácticas se adhieren por célula epitelial HEp-2. Por otra parte también se observó su patrón de adherencia.

23 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

23.1 Tolerancia a pH Ácidos

La tolerancia a pH bajos y sales de bilis es de gran importancia en la sobrevivencia y crecimiento de bacterias en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, estas características son uno de los principales prerrequisitos para que una bacteria sea considerada probiótica (Havenaar y col., 1992).

En la Tabla 16 se observan los resultados del crecimiento de las BAL-T a diferentes valores de pH. Todas las cepas demostraron buen crecimiento en un periodo de incubación de 4 h a valores de pH 4 y 5; esto se debe a que el pH óptimo de las bacterias lácticas es entre 4.5 a 6.5 (Prescott y col., 1999). A valores de pH 1, 2 y 3 la cepa *Enterococcus faecium* (10a) solamente tuvo un ligero crecimiento a 1 h de incubación; posteriormente no sobrevivió más tiempo. En el caso de la cepa *Enterococcus faecium* (18) se presenta poco crecimiento a los valores de pH de 0.5, 1, 2 y 3 durante 1, 2 y 4 h de incubación. Por otra parte, la cepa *Lactobacillus plantarum* (17) fue capaz de tener un buen crecimiento a los diferentes valores de pH durante 1 h de incubación; sin embargo, a 2 y 4 h ya no hubo crecimiento. Se ha reportado que algunas bacterias lácticas pueden sobrevivir y desarrollarse en presencia de un pH relativamente bajo debido a que poseen un sistema de transporte simultáneo de ácido láctico y de protones al exterior celular (Requena y Peláez, 1995).

Tabla 16 Tolerancia a pH bajos de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.

Tiempo (h)	1						2						4					
pH	0.5	1	2	3	4	5	0.5	1	2	3	4	5	0.5	1	2	3	4	5
Cepa																		
<i>P. pentosaceus</i> (11)	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> (12)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> (15L)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>A. viridans</i> (21)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> (22)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>E. faecium</i> (10a)	-	+	+	+	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i> (15a)	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>L. plantarum</i> (15c)	-	-	-	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++
<i>L. plantarum</i> (17)	++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++
<i>E. faecium</i> (18)	+	+	+	+	+++	+++	+	+	+	+	+++	+++	-	-	+	+	+++	+++

+++ Buen crecimiento, ++ Crecimiento moderado, + Poco crecimiento, - No hay crecimiento

En estudios similares, Goldin y col. (1992) reportaron sobrevivencia de *Lactobacillus* GG cuando fue sometido a pH 3 durante 4 horas. Charteris y col. (1998) encontraron que *L. casei* 212.3 y *Lactobacillus* GG tuvieron un buen crecimiento cuando se sometieron a un pH de 2.3 durante 3 horas; basados en estas características ellos las clasificaron como intrínsecamente tolerantes; es decir, que podría ser considerado intrínsecamente resistentes al transito gástrico humano, para llegar a la parte superior del intestino delgado, con un número

elevado de microorganismos después de la ingestión en el ayuno. En contraste, cuando crecieron *L. casei F19* este microorganismo cuando fue sometido a las mismas condiciones demostró una disminución de 10^9 ufc / mL a 10^3 ufc / mL y ellos lo consideraron como intrínsecamente sensible, es decir, que no toleran las condiciones del tracto gastrointestinal.

Jacobsen y col. (1999) estudiaron la sobrevivencia de 44 cepas de *Lactobacillus*, ellos reportaron que 29 cepas pudieron sobrevivir un pH de 2.5 durante 4 h. Mishra y Prasad (2005) trabajaron con 99 cepas de *Lactobacillus casei*; todas estas cepas fueron capaces de resistir un pH de 3 durante 3 h de incubación; sin embargo, tuvieron 2 cepas de *Lactobacillus casei* NCDC 17 y *Lactobacillus casei* C1 que resistieron valores de pH de 2. Las bacterias por lo general son sensibles a los valores de pH bajos que se encuentran en el estómago (Conway y col., 1987).

Se ha reportado que las bacterias lácticas típicamente encontradas en los alimentos no sobreviven a las condiciones gástricas y al pasaje del tracto gastrointestinal del humano (Hammes y col., 1997; Jin y col., 1998). Pero es posible seleccionar cepas que cumplan con estas características, para que puedan actuar como probióticos. Se ha visto que para su efecto benéfico es más importante que los probióticos sean consumidos dentro de una matriz de un alimento. Las bacterias pueden sobrevivir en condiciones ácidas *in vitro* cuando son inoculadas en la superficie de un alimento sólido, mientras que el mismo nivel de acidez es letal para el inóculo en un caldo acidificado.

La leche ha demostrado ser un excelente vehículo para las bacterias probióticas probablemente debido a su alta capacidad amortiguadora (Saxelin, 1998). La carne también actúa como un amortiguador en un medio ambiente ácido y por lo tanto, también puede proteger a las bacterias de ambientes hostiles. El efecto protector de algunos alimentos sólidos puede ser debido al aumento del pH del microambiente de las bacterias en la superficie del alimento (Waterman y Small, 1998).

En nuestros resultados, la respuesta de las cepas de BAL-T a estas condiciones hostiles fueron similares; la mayor parte de las cepas no resistieron valores de pH bajos, sin embargo, existen otros medios para llegar al tracto gastrointestinal, como es la microencapsulación para mejorar la sobrevivencia de las bacterias probióticas cuando se exponen a condiciones ácidas, a sales biliares y tratamientos térmicos (Ding y Shah, 2007).

23.2 Sobrevivencia a Jugo Gástrico Simulado

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las bacterias lácticas termotolerantes a la sobrevivencia de jugo gástrico simulado; tres cepas de *Pediococcus pentosaceus* (11, 15L y 15a), *Aerococcus viridans* (21) y *Enterococcus faecium* (18) mantienen constante su viabilidad durante los 90 min de incubación (Figura (a)); la cepa *Pediococcus pentosaceus* (12) y dos cepas de *Lactobacillus plantarum* (15c y 17) tuvieron la reducción de un ciclo logarítmico en los primeros 30 min de incubación; la cepa *Pediococcus pentosaceus* (22) tuvo una reducción

de 2 ciclos logarítmicos a los 60 min de incubación y *Enterococcus faecium* (10a) redujo su crecimiento 1.5 ciclos logarítmicos durante 60 min de incubación (Figura (b))

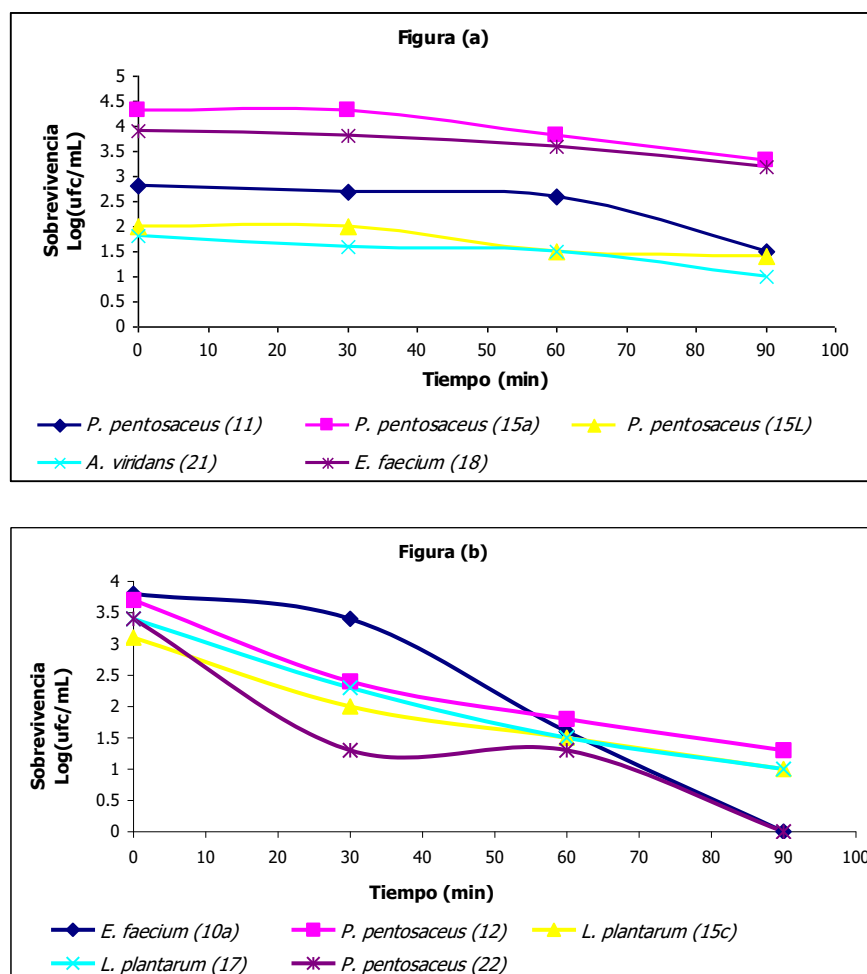


Figura 13 Sobrevivencia al jugo gástrico simulado a pH 2.0 de bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos.

Las bacterias destinadas para las funciones benéficas intestinales necesitan sobrevivir al paso a través de ambientes ácidos en el estómago. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el 50 % las cepas de BAL-T sobreviven bajo estas condiciones por lo menos 90 min, el tiempo necesario para alcanzar su sitio de acción en el intestino (Fernández y col., 2003).

Charteris y col. (1998) estudiaron la viabilidad de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*; ellos encontraron que presentaban pérdida de viabilidad en el tránsito de jugo gástrico simulado. Sólo una cepa de *L. fermentum* exhibe un apreciable nivel de sobrevivencia (30 % de su cuenta inicial) y es considerada tolerante al jugo gástrico simulado.

23.3 Tolerancia a Bilis

Algunos *Lactobacillus* pueden sobrevivir a altas concentraciones de bilis y con esto adaptarse a las condiciones del tracto gastrointestinal (Gilliland y col., 1984). En la Tabla 17 se muestran los resultados de la tolerancia a bilis de las BAL-Termotolerantes; estos resultados indican que 5 cepas pudieron crecer en todas las concentraciones de bilis utilizadas en este estudio (0.1, 0.3, 0.5, 1.0 y 2.0 %), estas cepas son: *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Enterococcus faecium* (10a) y *Pediococcus pentosaceus* (15a); las 5 cepas restantes: *Pediococcus pentosaceus* (11), *Aerococcus viridans* (21), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17) y *Enterococcus faecium* (18) tuvieron un crecimiento abundante a 0.5% de

bilis, y a concentraciones de 1 y 2 % su crecimiento fue menor. Estos resultados indican que todas las cepas pudieron crecer en concentraciones de bilis y que podrían atravesar las condiciones del tracto gastrointestinal.

Tabla 17 Tolerancia a bilis de bacterias lácticas termotolerantes

Concentración de Bilis (%) CEPA	0.1	0.3	0.5	1	2
<i>P. pentosaceus</i> (11)	++	++	++	+	+
<i>P. pentosaceus</i> (12)	++	++	++	++	++
<i>P. pentosaceus</i> (15L)	++	++	++	++	++
<i>A. viridans</i> (21)	++	++	++	+	+
<i>P. pentosaceus</i> (22)	++	++	++	++	++
<i>E. faecium</i> (10a)	++	++	++	++	++
<i>P. pentosaceus</i> (15a)	++	++	++	++	++
<i>L. plantarum</i> (15c)	++	++	++	+	+
<i>L. plantarum</i> (17)	++	++	++	+	+
<i>E. faecium</i> (18)	++	++	++	+	+

++ Mucho Crecimiento + Poco crecimiento

Antes que la bacteria no permanezca en el tracto gastrointestinal, su capacidad para sobrevivir depende de la resistencia a bilis. Los resultados concuerdan con los de Rondón y col. (2008); ellos evaluaron diferentes cepas de *Lactobacillus* aisladas del tracto gastrointestinal de pollo, y seleccionaron aquellas cepas resistentes al pH ácido y sales biliares. Como resultado obtuvieron 20 cepas con actividad probiótica, de las cuales 6 presentaron mejor tolerancia a pH bajos y a sales de bilis. Jin y col. (1998) realizaron un estudio en donde reportaron que 12 cepas de *Lactobacillus* aisladas de intestino de pollo, sobrevivieron a pH bajos y toleraron concentraciones de 0.3 % de bilis. Gilliland y col. (1984) concluyeron que 0.3 % de sales biliares es

una concentración crítica para la detección de cepas resistentes. Esto es similar a los resultados obtenidos por Gorbach y Goldin (1992) con *Lactobacillus* GG, el cual ha demostrado ser un probiótico para el consumo humano; los resultados también indicaron que 0.3 % de sales biliares, fue la concentración crítica para estas cepas. No obstante, los ácidos de bilis no-conjugados, a concentraciones bajas, pueden inhibir el crecimiento *in vitro* de los microorganismos (Fuller, 1992).

De acuerdo a nuestros resultados todas las cepas de bacterias lácticas termotolerantes crecen a concentraciones arriba de 0.3 %, lo cual significa que son buenas candidatas como bacterias probióticas.

23.4 Tolerancia a Ácido Taurocólico

La bilis es un esteroide producido en el hígado como sales biliares y secretado en el intestino a través de la vesícula biliar. Entre otras funciones su papel es facilitar la emulsión de las grasas de la dieta para que pueda ser digerida eficazmente. En la bilis encontramos que estas sales aparecen bajo la forma conjugada, en las que el ácido cólico se une a aminoácidos como la glicina o la taurina, formando ácido glicólico o taurocólico, respectivamente, o deconjugadas como es el desoxicolato de sodio (Madigan y col., 2006). Estas sales por sus propiedades detergentes también atacan a los microorganismos, afectando la estabilidad de la membrana de los mismos, pudiendo ocasionar su destrucción (Hofmann y Mysels, 1992).

En la Figura 14 (figura (a)) se muestra el crecimiento de las bacterias lácticas termotolerantes en ácido taurocólico (7 mM), en la cual se observa un buen crecimiento similar en todas las cepas del género *Pediococcus* como: *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15 L), *Pediococcus pentosaceus* (15a), *Pediococcus pentosaceus* (22) con respecto al control, y en la figura (b) también se observó buen crecimiento de las cepas de bacterias lácticas termotolerantes tales como: *Aerococcus viridans* (21), *Lactobacillus plantarum* (17), *Enterococcus faecium* (18) y *Enterococcus faecium* (10a) con respecto al control, a excepción de *Lactobacillus plantarum* (15c) que no tuvo crecimiento; esto nos indica que no sobrevivió al medio hostil. Sin embargo, nueve cepas las BAL-T sobrevivieron a esta concentración de sales biliares en forma conjugada, y además tuvieron crecimiento. No obstante, se sabe que algunas cepas de *Lactobacillus* no crecen en presencia de sales biliares conjugadas, pero si en presencia de las sales biliares de forma desconjugadas, probablemente por la ausencia de las enzimas que hidrolizan las sales biliares conjugadas (Suskovic y col., 1997).

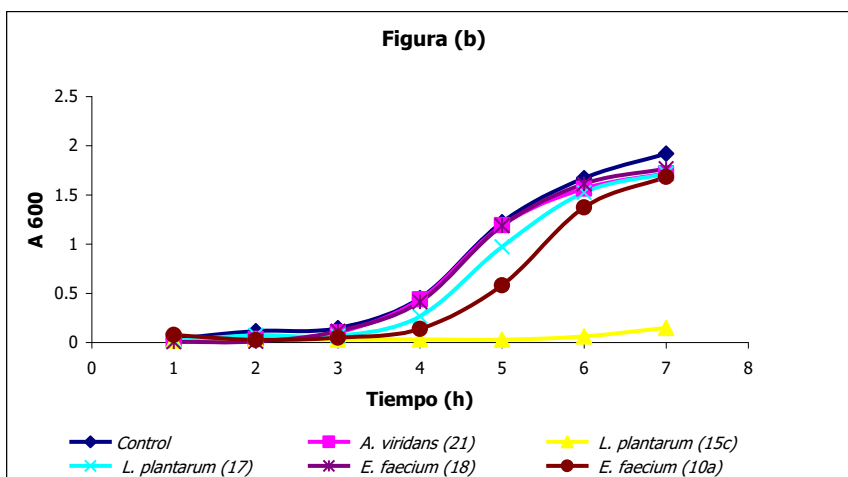
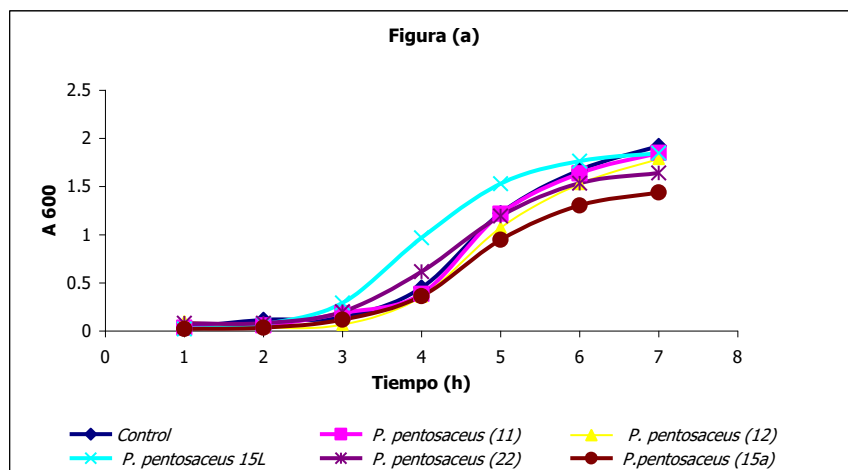


Figura 14 Inhibición de las bacterias lácticas termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos a ácido taurocólico.

Algunos estudios han reportado que haciendo ensayos *in vitro*, empleando cepas de *Lactobacillus reuteri* con actividad hidrolítica para las sales biliares, no se detectaron efectos perjudiciales, atribuyéndose esta propiedad probablemente a que las sales deconjugadas se adsorben sobre la superficie celular del lactobacilo, disminuyendo así su biodisponibilidad (De Boever y col., 2000). En el presente estudio, se emplearon sales biliares que contiene una mezcla de ambos tipos de sales y sales biliares en forma conjugada como el ácido taurocólico; las cepas de BAL-T lograron sobrevivir a estas condiciones hostiles. Algunos estudios similares han encontrado que la mayoría de las bacterias probióticas pueden crecer en medio MRS suplementado con sales de bilis conjugadas arriba de 0.5 % (Noriega y col., 2006).

En general se presentan buenos resultados de la tolerancia al ácido taurocólico de las BAL-T y por lo tanto, las hace microorganismos interesantes para este trabajo, debido a que cumplen una característica importante para ser probióticas.

23.5 Coagregación

Un buen ejemplo de las interacciones bacterianas es el fenómeno de agregación entre células que pertenecen a la misma cepa (autoagregación) o a diferente especie (coagregación) (Kmet y col., 1995). La capacidad de agregación se relaciona con las propiedades de la adhesión celular (Ouwehand y col., 1999). Se piensa que esta propiedad mejora la eliminación (por arrastre) y/o destrucción de patógenos en el tracto gastrointestinal (Charteris y col., 1998) ya que puede

resultar favorecido el que las sustancias antibacterianas producidas por los microorganismos probióticos sean efectivas contra bacterias patógenas con las cuales puedan coagregar.

En la Tabla 18 se observa la capacidad de coagregación de las bacterias lácticas termotolerantes, aisladas de productos cárnicos cocidos, en este análisis se probaron dos cepas indicadoras; *E. coli* O139:H26 y *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23. Todas las cepas probadas demostraron capacidad de coagregación. Sin embargo, la mejor capacidad de coagregación con *E. coli* O139:H26 la presentaron las cepas *Pediococcus pentosaceus* (12) y *Enterococcus faecium* (18) con porcentajes de 26.33 y 23.56 respectivamente; las 8 cepas restantes obtuvieron una baja capacidad de coagregación. En el caso de *Aerococcus viridans* (21), *Pediococcus pentosaceus* (15a) y *Enterococcus faecium* (18), tuvieron los mejores porcentajes de coagregación con *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23 con valores de 17.29, 16.11 y 32.71 % respectivamente.

Tabla 18 Capacidad de coagregación de las bacterias lácticas termotolerantes con *E. coli*O139:H26 y *Salmonella parera IV* O11:Z4Z23

Cepa	% Coagregación con <i>E. coli</i> O139:H26	% Coagregación con <i>Salmonella</i> <i>parera IV</i> O11:Z4Z23
<i>P. pentosaceus</i> (11)	5.72	4.87
<i>P. pentosaceus</i> (12)	26.33	2.13
<i>A. viridans</i> (21)	12.55	17.29
<i>P. pentosaceus</i> (22)	5.34	5.53
<i>P. pentosaceus</i> (15L)	11.04	1.8
<i>P. pentosaceus</i> (15 ^a)	5.06	16.11
<i>L. plantarum</i> (15c)	5.97	6.71
<i>E. faecium</i> (10a)	6.31	8.81
<i>L. plantarum</i> (17)	2.49	0.48
<i>E. faecium</i> (18)	23.56	32.71

Por otro lado, la coagregación puede ser un factor importante en el establecimiento y el mantenimiento de la microflora para prevenir una infección gastrointestinal y urogenital. Se ha sugerido que los *Lactobacillus* en el epitelio urogenital y la capacidad de estos microorganismos para interactuar con uropatógenos, pueden constituir un importante mecanismo de defensa del huésped contra infecciones (Reid y col., 1988).

Kos y col. (2003) evaluaron la capacidad de agregación y adhesión de *Lactobacillus acidophilus* M92 utilizando como cepas indicadoras a dos cepas de probióticas: *Lactobacillus plantarum* L4 y *Enterococcus faecium* L3, y dos cepas patógenas: *E. coli* 3014 y *Salmonella* con serotipo *thyphimurium*. Los resultados obtenidos después de 5 h de incubación fueron porcentajes de coagregación de *L.*

acidophilus M92 de 4.36, 19.46, 15.11 y 15.70 %, por lo tanto, concluyeron que el ensayo de coagregación establecido entre *L. acidophilus* M92 y las dos cepas probióticas, especialmente *E. faecium* L3, podrían aumentar su potencial de colonización si fueran utilizados en una mezcla de cultivos, además de coagregar con microorganismos patógenos lo cuál puede constituir un importante mecanismo de defensa en el tracto urogenital y en el tracto gastrointestinal.

En general nuestros resultados indican que por lo menos el 20 % de las cepas de BAL-T interactúan con *E. coli* y el 30 % interactúan con *Salmonella*, pudiendo desempeñar un papel importante en la eliminación de patógenos en el tracto gastrointestinal.

23.6 Autoagregación

A la agregación bacteriana entre microorganismos del mismo género, se le llama autoagregación; ésta es de considerable importancia en varios nichos ecológicos, especialmente en el intestino humano donde los probióticos pueden estar activos (Jankovic y col., 2003).

En la Tabla 19 se presentan los porcentajes de autoagregación de las bacterias lácticas termotolerantes a las 2 y 24 h de incubación. Los resultados muestran porcentajes de autoagregación entre 1.24 y 23.25 % a las 2 h de incubación, obteniendo los porcentajes más altos 3 cepas de *Pediococcus pentosaceus* (11, 15L y 22) y 2 cepas de *Lactobacillus plantarum* (15c y 17) con valores de 18.96,

20.24, 17.74, 23.25 y 15.3 % respectivamente y a las 24 h de incubación todas las cepas de BAL-T tuvieron un aumento en su porcentaje, obteniendo los porcentajes más altos 2 cepas de *Pediococcus pentosaceus* (11 y 22) y 2 cepas de *Lactobacillus plantarum* (15c y 17) con valores de 28.78, 29.77, 23.8, 43.8 y 33.53 % respectivamente; sin embargo, la cepa *Pediococcus pentosaceus* (15a) a las 2 h de incubación tuvo 7.39 % de capacidad autoagregativa y a las 24 h su porcentaje aumentó 3 veces mas con el 25.1 % de capacidad autoagregativa. Esto pudo deberse al tiempo de incubación para adaptarse al medio. Collado y col. (2007) consideraron altos porcentajes de autoagregación desde 7.2 a 17.4 % después de 20 h de incubación, y a las 24 h de incubación porcentajes desde 20.6 a 37.7 %. Tomando en cuenta estos porcentajes, podemos decir que la autoagregación de las bacterias BAL-T en este trabajo es alta; es decir, nuestros resultados indican que el 80 % de las BAL-T demostraron una buena capacidad de autoagregación a las 24 h de incubación, lo cual sugiere que son microorganismos importantes para la formación de biopelículas y para la colonización del tracto gastrointestinal.

Tabla 19 Capacidad de autoagregación de las bacterias lácticas termotolerantes durante 2 y 24 h de incubación.

Cepa	Tiempo de incubación (h)	
	2	24
<i>P. pentosaceus</i> (11)	18.96	28.78
<i>P. pentosaceus</i> (12)	3.59	6.59
<i>A. viridans</i> (21)	4.26	5.11
<i>P. pentosaceus</i> (22)	20.24	29.77
<i>P. pentosaceus</i> (15L)	17.74	23.8
<i>P. pentosaceus</i> (15a)	7.39	25.1
<i>L. plantarum</i> (15c)	23.25	43.83
<i>E. faecium</i> (10a)	1.24	7.4
<i>L. plantarum</i> (17)	15.3	33.53
<i>E. faecium</i> (18)	2.9	9.7

Esto indica que estas cepas tienen la posibilidad de formar una barrera para prevenir la colonización de microorganismos patógenos (Schachtsiek y col., 2004; Schellenberg y col., 2006). Esto puede deberse a la modificación del microambiente en el entorno de microorganismos patógenos y a la producción de sustancias inhibitorias de las bacterias lácticas (Pérez y col., 1998; Del Re y col., 2000). Bujnakova y Kmet (2002) estudiaron el efecto de 27 *Lactobacillus* aislados de carne de pollo y de vaginas de ternera con capacidad autoagregativa. Ellos encontraron actividad coagregativa en 8 cepas de *Lactobacillus* utilizando cepas de *E. coli* O157 entero hemorrágica como microorganismo indicador; esto ocurrió por la presencia de un factor de promoción agregativa (APF) detectado por PCR.

Collado y col. (2007) evaluaron la adhesión a la superficie celular y la capacidad agregativa de cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Enterococcus faecium*.

Con formato: Normal

Considerando que la capacidad autoagregativa se correlaciona con la adhesión, el cual es un prerequisite para la colonización e infección de muchos patógenos en el tracto gastrointestinal. Mientras que la coagregación se ha relacionado con la capacidad de interactuar estrechamente con patógenos. Ellos obtuvieron resultados que indicaron que la capacidad autoagregativa, junto con la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de coagregación con cepas patógenas, pueden ser usadas para la selección preliminar para identificar bacterias probióticas potencialmente aptas para el consumo humano o uso de animales.

23.7 Ensayo de Adherencia a Células HEp-2

Uno de los principales criterios para la selección de cepas probióticas es su capacidad de adherirse a la superficie intestinal (Granato y col., 1999). La adhesión de microorganismos probióticos a la mucosa intestinal es un prerequisite para la colonización y para la actividad antagónica contra enteropatógenos. Al alcanzar el intestino, los probióticos deben sujetarse a la extremidad de pelos o microvellosidades y adherirse a la capa de mucosidad, a fin de no ser barridos con la peristálsis en el colon (Fernández y col., 2003). La mucosa intestinal es un modelo clásico para probar *in vitro* la capacidad de adherencia. Varios receptores son potencialmente localizados en la mucosa de los intestinos grueso y delgado mediante una adhesión específica de cualquiera de las bacterias benéficas o patógenas (Li y col., 2008).

El ensayo de adhesión se llevó a cabo utilizando la línea celular HEp-2 (células derivadas de cáncer faríngeo humano) descrita por Cravioto y col. (1979). En la Figura 15 se muestra el control de la adherencia agregativa de *E. coli* 87125. En las Figuras 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23, 24 y 25, se observa la adhesión de las bacterias lácticas termotolerantes de *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15 L), *Aerococcus viridans* (21), *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (15a), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17) y *Enterococcus faecium* (18), considerando una adhesión positiva debido a que se encuentran más de 10 bacterias lácticas por célula epitelial HEp-2 y más del 40 % de células con adherencia, demostrando una fuerte adherencia, lo cual hace que estos resultados sean determinantes. En la Figura 20, se muestra la adherencia de la cepa *Pediococcus pentosaceus* (22) notándose más escasa que las demás cepas de BAL-T, sin embargo, cumple con lo propuesto por Ehrmann y col. (2002) ya que se denota positiva si más de 10 bacterias lácticas se adhieren por célula epitelial HEp-2, por lo tanto, se le considera que tiene una buena capacidad de adhesión. La adhesión en este trabajo se realizó de manera diferente, debido a que se utilizó la línea celular HEp-2 en contraste a otros trabajos que han sido reportados para la adhesión de cepas de *Lactobacillus*, en los cuales se emplean líneas celulares intestinales Caco-2 y HT-29. Sin embargo, los niveles de adhesión obtenidos en este trabajo pueden ser

comparables con los resultados obtenidos con células Caco-2 y HT-29, debido a que la línea celular HEP-2 se utiliza como un sistema modelo para la adhesión de cepas de *E. coli* enterotoxigénicas capaces de causar enfermedades diarreicas en el hombre y animales, demostrando que en la superficie poseen pilis que se adhieren a las células epiteliales intestinales y colonizan el intestino delgado (Smith y Longgood, 1971). De esta manera evaluamos la adhesión de las BAL-T para su colonización en el tracto gastrointestinal. La adherencia de las bacterias lácticas termotolerantes es consistente con estudios anteriores en los que se reporta que los *Lactobacillus* se adhieren a las células intestinales humanas por medio de un mecanismo que involucra diferentes combinaciones de carbohidratos y proteínas en la superficie celular bacteriana (Chauvière y col., 1992). En el ensayo de adherencia realizado para las diez cepas de BAL-T estudiadas, se observaron patrones similares a los informados en los estudios realizados por Nataro y col., 1987, y Vidal y col., 2007. Estos autores, describen cuatro patrones de adherencia: agregativo, difuso, localizado y parecido al localizado. En nuestros resultados, nueve cepas de BAL-T (*Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (15 L), *Aerococcus viridans* (21), *Enterococcus faecium* (10a), *Pediococcus pentosaceus* (15a), *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17) y *Enterococcus faecium* (18)) tuvieron un patrón de adherencia difusa y la cepa *Pediococcus pentosaceus* (12) presentó un patrón de adherencia parecida a la localizada.

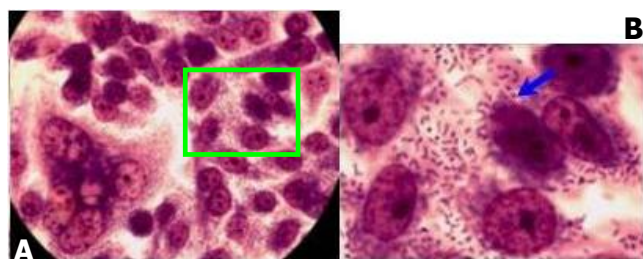


Figura 15 (A) Control de la adhesión agregativa de *E. coli* 87125 en células epiteliales HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

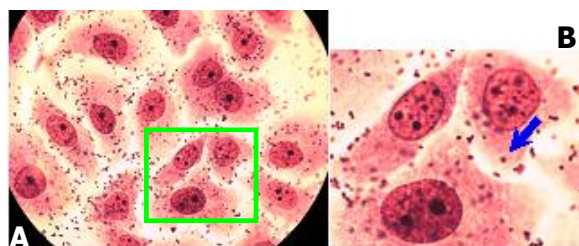


Figura 16 (A) Adhesión difusa de *Pedicoccus pentosaceus* (11) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

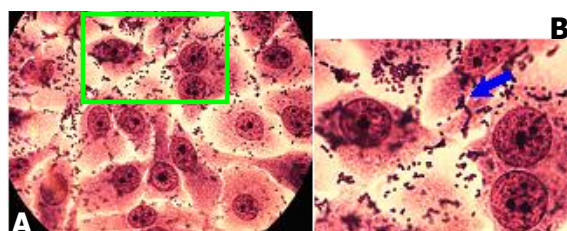


Figura 17 (A) Adhesión parecida a la localizada de *Pedicoccus pentosaceus* (12) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

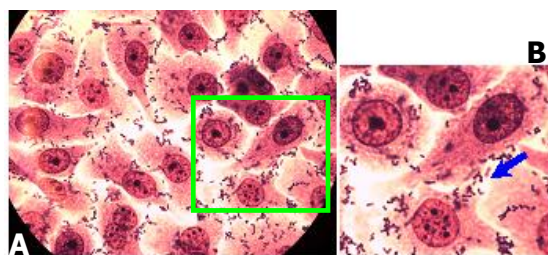


Figura 18 (A) Adhesión difusa de *Pediococcus pentosaceus* (15 L) en células HEp-2 a 100 X. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

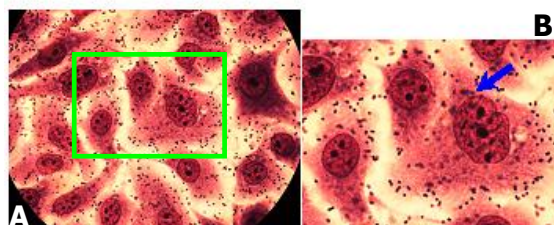


Figura 19 Adhesión difusa de *Aerococcus viridans* (21) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

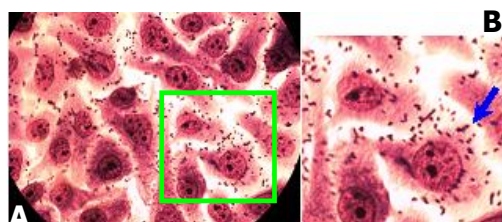


Figura 20 (A) Adhesión difusa de *Pediococcus pentosaceus* (22) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

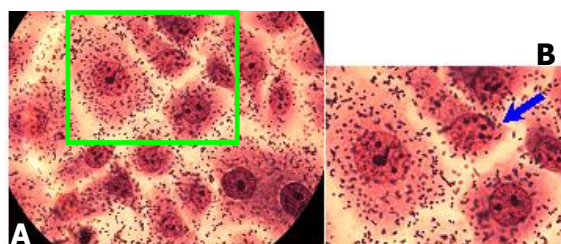


Figura 21 (A) Adhesión difusa de *Enterococcus faecium* (10a) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de una parte de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

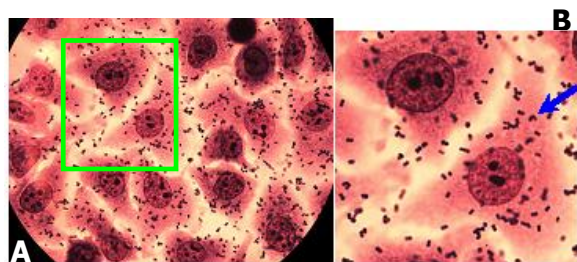


Figura 22 (A) Adhesión difusa de *Pediococcus pentosaceus* (15a) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

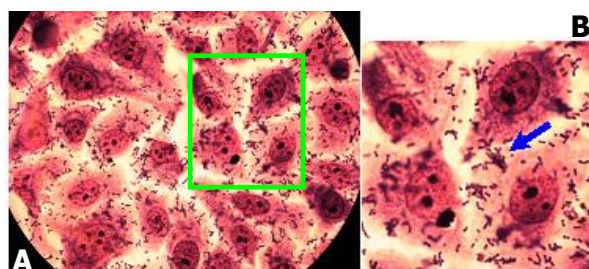


Figura 23 (A) Adhesión difusa de *Lactobacillus plantarum* (15c) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

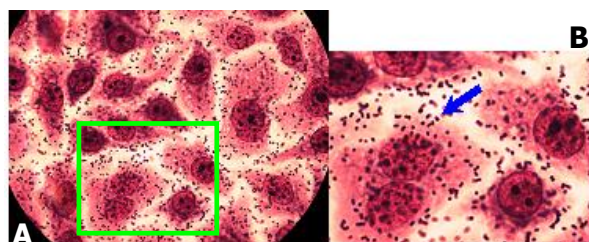


Figura 24 (A) Adhesión difusa de *Lactobacillus plantarum* (17) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

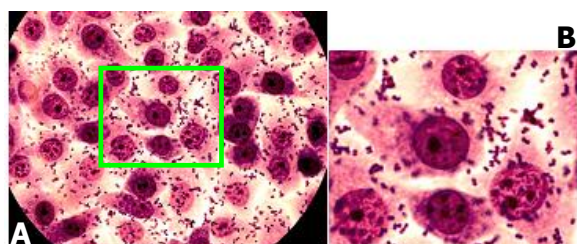


Figura 25 (A) Adhesión difusa de *Enterococcus faecium* (18) en células HEp-2 a 100 x. **(B)** es un aumento de la parte señalada con un marco verde de la Fig. A, para visualizar mejor la adherencia; la flecha indica bacterias adheridas a la célula.

Garriga y col. (1998) seleccionaron 296 cepas de bacterias lácticas del tracto gastrointestinal de pollo, 77 mostraron inhibición contra cepas entéricas indicadoras a *Salmonella enteritidis* y *E. coli*; ocho diferentes cepas identificadas como *Lactobacillus salivarius* fueron seleccionados para los siguientes atributos: su capacidad de inhibir todos los indicadores de las cepas, una adhesión de alta eficiencia a las células epiteliales de los pollos y también su resistencia a una serie de antibióticos. La competitividad de la cepas prometedoras *L. salivarius* CTC2183 y CTC2197 fueron evaluadas *in vivo*. Ellos concluyeron que ambas cepas fueron capaces de convertirse en la flora autóctona y demostraron que fueron capaces de colonizar el tracto gastrointestinal.

Ehrmann y col. (2002) evaluaron 112 cepas de bacterias lácticas provenientes de pato, utilizando métodos *in vitro* en los cuales incluyeron la autoagregación, coagregación, la hidrofobicidad de la superficie y la adhesión en células HEp-2

entre otras características. Ellos obtuvieron propiedades de autoagregación y coagregación significativas, teniendo una fuerte adherencia con células HEp-2. Ellos concluyeron que la mayoría de sus cepas de *Lactobacillus* exhiben un gran potencial como probióticos. Por otra parte, Tuomola y Salminen (1998) compararon la capacidad de adhesión de 12 cepas de *Lactobacillus*, utilizando la línea celular Caco-2 como modelo *in Vitro*; ellos obtuvieron la adhesión más alta con la cepa *L. casei* con un valor del 14.4 % y la más baja fue observada para otra cepa de *L. casei rhamnosus* con un valor de 2.6 %. Con estos resultados concluye que existe variabilidad en la capacidad de los probióticos para adherirse a las células intestinales y que podría explicarse por el origen de la cepa y por las propiedades de la superficie.

En otros estudios, Pennacchia y col. (2006) evaluaron la capacidad adherente de 11 cepas de *Lactobacillus* aisladas de embutidos fermentados por ensayos *in vitro* utilizando la línea celular Caco-2; las 11 cepas poseen buena capacidad de adhesión a la monocapa de células Caco-2, en particular 8 cepas pertenecientes al grupo de *Lactobacillus plantarum* demostraron el mayor número final de células adherentes. Delgado y col. (2008) analizaron características como probióticos de 187 cepas de *Bifidobacterium* aisladas de la mucosa y heces de un adulto sano; ellos realizaron el ensayo *in vitro* de la adhesión usando la línea celular Caco-2, y observaron que todas las cepas analizadas se adhirieron a las células epiteliales. Basados en los análisis realizados, ellos concluyeron que las cepas de

Bifidobacterium catenulatum, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium pseudocatenulatum* podrían ser propuestas como nuevos candidatos probióticos.

Las 10 cepas de BAL-T poseen una buena capacidad de adhesión a células HEp-2, lo cual indica que podrían adherirse a células intestinales.

24 CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no todas las cepas de las BAL-T resisten valores bajos de pH; sin embargo, todas ellas resistieron concentraciones importantes de sales biliares que se requieren para la colonización intestinal, por lo tanto, estas cepas pueden llegar al tracto gastrointestinal y sobrevivir en él.

Con relación a la capacidad de coagregación, el 20 % de las cepas interactuaron con *E. coli* O139:H26 y el 30 % con *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23. El 60 % de las bacterias cuentan con buena capacidad de autoagregación, es decir pueden formar una barrera para prevenir la colonización por patógenos.

Finalmente las cepas estudiadas poseen una alta capacidad de adherencia a células epiteliales HEp-2.

Por todo lo anteriormente expuesto, las BAL-T estudiadas en este trabajo podrían ser utilizadas para elaborar productos cárnicos cocidos con potencial probiótico.

25 CONCLUSIONES GENERALES

Se identificaron 10 cepas de bacterias lácticas homofermentativas como: *Pediococcus pentosaceus* (11), *Pediococcus pentosaceus* (12), *Pediococcus pentosaceus* (15L), *Pediococcus pentosaceus* (22), *Pediococcus pentosaceus* (15a) *Lactobacillus plantarum* (15c), *Lactobacillus plantarum* (17), *Enterococcus faecium* (10a), *Enterococcus faecium* (18) y *Aerococcus viridans* (21). Las cuales se han reportado como parte de la microbiota normal de la carne y de los productos cárnicos cocidos examinados en este estudio.

De acuerdo con la identificación genotípica las bacterias lácticas que se encontraron fueron: cinco cepas de *Pediococcus pentosaceus*, dos cepas de *Lactobacillus plantarum*, dos cepas de *Enterococcus faecium* y una cepa de *Aerococcus viridans*. La identificación de la secuenciación del gen 16S ARNr no coincidió con la identificación bioquímica, lo cual ha sido reportado en otros estudios.

La termotolerancia de algunas BAL es importante para que puedan ser utilizadas como cultivos bioprotectores en productos cárnicos cocidos. Al respecto, las diez cepas de BAL toleraron temperaturas de 70 °C por 30 min.

Las bacterias lácticas termotolerantes solo produjeron actividad antagónica en contra del género *Pseudomonas*, bajo las condiciones utilizadas en este estudio. Sin embargo, una de las bacterias lácticas produjo actividad antagónica contra otra

bacteria láctica. Todas ellas tuvieron una buena producción de ácido láctico debido a su carácter homofermentativo, pero la producción de ácido acético fue menor. Estos resultados indican que estas bacterias podrían ser aplicadas en productos cárnicos, debido a que tienen efecto positivo de inhibición sobre el género *Pseudomonas* que es predominante en la carne y productos cárnicos en refrigeración, ocasionando deterioro de la misma.

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que no todas las cepas de las BAL-T resisten valores bajos de pH; sin embargo, todas ellas resistieron concentraciones importantes de sales biliares que se requieren para la colonización intestinal, por lo tanto, estas cepas pueden llegar al tracto gastrointestinal y sobrevivir en él.

Con relación a la capacidad de coagregación, el 20 % de las cepas interactuaron con *E. coli* O139:H26 y el 30 % con *Salmonella parera* IV O11:Z4Z23. El 60 % de las bacterias cuentan con buena capacidad de autoagregación, es decir pueden formar una barrera para prevenir la colonización por patógenos.

Finalmente las cepas estudiadas poseen una alta capacidad de adherencia a células epiteliales Hep-2.

Se concluye que las bacterias lácticas termotolerantes podrían ser utilizadas para elaborar productos cárnicos cocidos con potencial probiótico garantizando un efecto benéfico. Además, como se aislaron de la microflora nativa de estos productos cárnicos, al ser inoculadas a los mismos, se puede suponer que se

desarrollarán adecuadamente en ellos, proporcionando así, los beneficios esperados.

26 PERSPECTIVAS DEL TRABAJO

Quedan algunas líneas de acción para consolidar la investigación realizada en esta tesis:

- Es recomendable que las cepas de bacterias lácticas termotolerantes, que no resistieron valores de pH bajos, se encapsulen con alginatos o goma arábica, para verificar su llegada al tracto gastrointestinal.
- Es conveniente investigar la capacidad de adhesión en líneas celulares epiteliales intestinales como Caco-2 y HT-29, para complementar los resultados obtenidos en este trabajo.
- Desarrollar la aplicación de las bacterias lácticas termotolerantes con potencial probiótico asociadas con prebióticos para obtener un producto cárnico simbiótico.

27 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmen, F.E. (2003). Genetically modified probiotics in foods. *Trends in Biotechnology*. 21(11): 491-497.
- Alakomi, H. L., Skytta, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. y Helander, I. (2000). Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disturbing the outer membrane. *Applied Environmental Microbiology*. 66: 2001-2005.
- Álvarez-Olmos, M.I. y Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: A modern perspective on a traditional therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 32: 1567-1576.
- Anderson, W., Hedges, N., Jones M., Cole, M. (1991). Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* studied by differential scanning calorimetry. *Journal of General Microbiology*. 137: 1419-1424.
- Andrighetto, C., Zampese, L. y Lombardi, A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausage of Veneto region (Italy). *Letters in Applied Microbiology*. 33:26-30.
- Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yahanaka, H., Akimoto, M., Kanai, S. y Miki, T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. *Journal of Food Science*. 63(3): 544-547.

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects. eds. Salminen, S. and von Wright, A. , 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 1-72.

Axelsson, L. (2004). Chapter 1 Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. In: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. S. Salminen, A. von Wright & A. Ouwehand (Eds.). 3a. edition. Marcel Dekker. New York, U.S.A. pp.1-66.

Aymerich, T., Martín, B., Garriga, M. y Hugas M. (2003). Microbial quality and direct PCR identification of lactic acid bacteria and nonpathogenic staphylococci from artisanal low-acid sausage. *Applied and Enviromental Microbiology*. 69 (8): 4583-4594.

Beales, N. (2004). Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH and osmotic stress. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 3:1-20.

Beijerinck, M.W. (1901). Ueber Oligonitrophile Mikroben Centralblatt F. *Bakteriologie, Parte II* (7): 561-582.

Bhunia, A. K., Johnson, M.C. y Ray, B. (1988). Purification characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. *Journal Applied Bacteriology*. 65:261-268.

- Blum, S., Reinero, R., Schiffrin, E.J., Crittenden, R., Mattila, S. T., Ouwehand, A.C., Salminen, S., von Wright, A., Saarela, M., Saxelin, M., Collins, K. y Morelli, L. (1999). Adhesion studies for probiotics: need for validation and refinement. *Trends Food Science Technology*. 10:405–410.
- Borch, E. y Agerhem, H. (1992). Chemical, microbial and sensory changes during the anaerobic cold storage of beef inoculated with a homofermentative *Lactobacillus* sp. or a *Leuconostoc* sp. *International Journal of Food Microbiology*. 15:99-108.
- Brus, S. y Coote, P. (1999). Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. 50: 1-17.
- Buchanan, R.L., Palumbo, S.A. (1985). *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas sobria* as potential food poisoning species: a review. *Journal of Food Safety*. 17:15-29.
- Bujnakova, D y Kmet, V. (2002). Aggregative of animal Lactobacilli with O157 Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Veterinary Medicine series B*. 49:152-154.
- Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L. A., Marecat, A. y Mercenier, A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *Journal of Microbiology Methods*. 44:139-148.

- Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially Probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 759-768.
- Chauvière, G., Coconnier, M. H., Kerneis, S., Fourniat, S. y Servin, A. L. (1992). Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Journal of General Microbiology*. 138:1689-1696.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. y Hernández, P. E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science Technology International*. 7(4):281-305.
- Cocolin, L., Manzano, M., Canton, C. y Comi, G. (2000). Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus spp.* isolated from naturally fermented Italian sausage using a polymerase chain reaction temperature gradient gel electrophoresis. *Letters in Applied Microbiology*. 30:126-129.
- Cocolin, L., Rantsiou, K., Iacumin, L., Urso, R. Cantoni, C. y Comi, G. (2004). Study of the ecology of fresh sausage and characterization of populations of lactic acid bacteria by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(4): 1883-1894.
- Collado, M. C., Surono, I., Meriluoto, J. y Salminen, S. (2007). Indigenous Dadih Lactic Acid Bacteria: Cells-Surface Properties and Interactions with Pathogens. *Journal of Food Science*. 72(3):89-93.

- Collins, M. D., Williams, A.M. y Wallbanks, S. (1990). Phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis: description of *Tetragenococcus* gen. nov. *FEMS Microbiology Letters*. 70: 225-262.
- Collins, M.D., Ash, C., Farrow, J.A.E., Wallbanks, S. y Williams, A.M. (1989). 16S Ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp. nov. *Journal of Applied Bacteriology*. 67: 453-460.
- Collins, M.D., Rodriguez, U., Ash, C., Aguirre, M, Farrow, J.A.E., Martinez-Murcia, A., Phillips, B.A., Williams, A.M. y Wallbanks, S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related acid lactic bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 77(1): 5-12.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L. y Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science*. 70:1-12.
- Coronato, S., Di, G.W., Salas, M., Spinelli, O. y Laguens, G. (1999). Biología de las proteínas del shock termico. *Medicina*. 59:477-486.
- Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Microbiology Reviews*. 3:777-788.

- Cravioto, A., Gross, R. J., Scotland, S. M. y Rowe, B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology*. 3:95–99.
- Daeschel, M. A. (1983). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*. 44(1):164-167.
- Dahly, T. A., Midden, W. R. y Hartman, P. E. (1989). Comparison of killing of gram negative and gram positive bacteria by pure single oxygen. *Journal of Applied Bacteriology*. 171: 2188-2194.
- Dalezios, I., y Siebert, K.J. (2001). Comparison of pattern recognition techniques for the identification of lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 91:225-236.
- De Boever, P., Wouters, R., Verschaeve, L., Berckmans, P., Schoeters, G. y Verstraete, W. (2000). Protective effect of the bile salt hydrolase–active *Lactobacillus reuteri* against bile salt cytotoxicity. *Applied and Microbiology Biotechnology*. 53 :709–714.
- De Koos, J. T. (1992). Lactic acid and Lactate. *International Food Marketing and Technology*. 3: 5-6.
- De Man, J. C., Rogosa, M. y Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacillus*. *Journal of Applied Bacteriology*. 23(1): 130-135.

- Del Re, B., Sgorbati, B. Miglioli, M. y Palenzona, D. (2000). Adhesión, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*. 31:438-442.
- Delgado, S., O'Sullivan, E., Fitzgerald, G. y Mayo, B. (2008). *in vitro* evaluation of the probiotic properties of human intestinal *Bifidobacterium* species and selection of new probiotic candidates. *Journal of Applied Microbiology*. 104:1119-1127.
- Ding, W.K. y Shah, N.P. (2007). Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. *Journal of Food Science*. 72(9):446-450.
- Du Plessis, H. W., Dicks, L. M. T., Pretorius, I. S., Lambrechts, M. G. y du Toit, M. (2003). Identification of lactic acid bacteria isolated from South African brandy base wines. *International Journal of Food Microbiology*. 20: 1-11.
- Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E. M. M., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. y Kevin, J. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76:279-292.
- Ehrmann, M.A., Kurzak, P., Bauer, J. y Vogel, R.F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of Applied Microbiology*. 92:966-975.

- Ennahar, S., Cai, Y. y Fujita, Y. (2003). Phylogenetic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. *Applied Environmental Microbiology*. 69(1):444-451.
- Erkkila, S. y Petaja, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat Science*. 55:297–300.
- Farkas, M. C., Farkas, J., Meszaros, L., Reichart, O. y Andrassy, E. (1999). Thermal denaturation of bacterial cells examined by differential scanning calorimetry. *Journal of Thermal Analysis Calorimetry*. 57:409-414.
- Feder, M.E. (1999). Heat-shock proteins molecular chaperones and the stress response: *Evolutionary and Ecological Physiology. Annual Review of Physiology*. 61:243-282.
- Fernandez, M., F. Boris, S. y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 94: 449-455.
- Fernández, T., Marcet, M, y Martin. W. (2008). Aislamiento y evaluación de cepas termotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* para producción de aguardientes y rones. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 6(1): 64-70.

- Ferreira, M.J., Alencar, T.M., Alencar, M.C. y Miranda, G.L.A. (2003). Antibacterial activity of lactic culture isolated of Italian salami. *Brazilian Journal of Microbiology*. 34(supl. 1): 121-122.
- Fonseca, F., Béal, C. y Corrieu, G. (2001). Operating conditions that affect the resistance of lactic acid bacteria to freezing and frozen storage. *Cryobiology*. 43(3): 189-198.
- Fragoso, L. S. y Fernández, M. R. (1999). Las bacterias lácticas como probióticos y biopreservantes. *Legislación Alimentaria de la CEE. Sección # 6. Leches y Productos lácteos*. 1:92-94.
- Franz, C. M. y Von Holy, A. (1996). Thermotolerance of meat spoilage lactic acid bacteria and their inactivation in vacuum-packaged vienna sausages. *International Journal of Food Microbiology*. 29(1):59-73.
- Franz, C.M.A.P. y Holzapfel, W.H. (2004). Lactic acid bacteria Microbiological and Functional aspects Chapter 6 in The genus *Enterococcus*: biotechnological and safety issues. In: Salminen, S., von Wright, A., Ouwehand, A. (Eds.), 3rd ed. Revised and expanded. Marcel Dekker, inc., pp. 199–247.
- Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. y Stiles, M.E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety?. *International Journal of Food Microbiology*. 47:1–24.

- Fuller, R. (1989). A review. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66: 365-378.
- Fuller, R. (1992). Modification of intestinal microflora using probiotics and prebiotics. *Scandinavia Journal of Gastroenterology*. 222:28-31.
- Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. y Hugas M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken Probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology*. 84:125-132.
- Geis, A. (2007). Chapter 5. Genetic Engineering of Bacteria Used in Food Fermentation .In: Genetically Engineered Food: Methods and Detection. 2nd edition. KJ Heller (Editor). Wiley-VCH pp. 109-132.
- Georgopolous, C. y Welch, W.J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Annual Review of Cell Biology*. 9:601-634.
- Gilliland, S. E., Staley, T. E. y Bush, L.J. (1984). Importance in bile tolerans of *Lactobacillus acidophilus* used as a diatery adjunct. *Journal of Dairy Science*. 67:3045-3051.
- Goldin, B. R., Gorbach, S. L., Saxelin, M., Barakat, S. Gauthieri, L. y Salminen, S., (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain GG) in human gastrointestinal tract. *Digestive Diseases and Sciences*. 37:121-128.
- González, V.A., Vaccari, G., Dosi, E. Trilli, A., Rossi, M. y Matteuzzi, D. (2000). Enhanced production of L (+) – lactic acid in chemostat by *Lactobacillus casei* DSM 20011 using ion – exchange resins and cross – flow filtration in a

- fully automated pilot plant controlled via. *Biotechnology and Bioengineering*. 67(2): 147–156.
- Gouesbet, G., Jan, G. y Boyaval, P. (2001). *Lactobacillus delbruekii ssp bulgaricus* thermotolerance. *Agriculture, Biology & Environmental Science*. 81(2):301-309.
- Granato, F., Perotti, I., Masserey, M., Rpouvet, M., Golliard, y Servin, A. (1999). Cell surface-associated lipoteichoic acid acts as an adhesion factor for attachment of *Lactobacillus johnsonii* La1 to human enterocyte-like Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(3):1071-1077.
- Guerrero, L.I. y Arteaga, M.R. (1990). Tecnología de Carnes. Elaboración y Preservación de Productos Cárnicos. Editorial Limusa, México, D.F.
- Hammes, W., Haller, D., Brassart, D. y Bode, C. (1997). Traditional starter cultures as probiotics. *Microecology Ther*. 26:97-114.
- Handley, P. S., Harty, D. W., Wyatt, J. E., Brown, C. R., Doran, J. P. y Gibbs, A. C. (1987). A comparison of the adhesion, coaggregation and cell-surface hydrophobicity properties of fibrillar and fimbriate strains of *Streptococcus salivarius*. *Journal of General Microbiology*. 133(11): 3207-3217.
- Harrigan, W. F. (1998). Chapter 10 Cultivation Microaerobic and Carbon Dioxide-enriched Atmospheres. In: Laboratory Methods in Food Microbiology. Harrigan, W. F. (Ed.). 3^{era} edition. Academic Press San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo y Toronto. Pp. 98-99.

- Harwood, V. J., Delahoya, N.C., Ulrich, R.M., Kramer, M.F., Whitlock, J.E., Garey, J.R. y Lim, D.V. (2004). Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology*. 38:476-482.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in y Veld, J. (1992). Selection of strains for probiotic use. Probiotics In: The Scientific Basis. Fuller, R., (Ed.), Chapman & Hall, London, England, pp. 209-224.
- Helander, Y., Von Wright, A. y Mattila, T. (1997) Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science and Technology*. 8: 146-150.
- Hofmann, A., y Mysls, K. (1992). Bile Salt solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca^{++} ions. *Journal of Lipid Research*. 33(102):617-626.
- Hofvendahl, K. y Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 26: 87-107.
- Holley, R. A., Guan Y. T., Peirson, M. y Yost, Ch. K. (2002). *Carnobacterium viridans* sp. nov., an alkaliphilic, facultative anaerobe isolated from refrigerated, vacuum-packed bologna sausage. *International Journal of Systematic and Evaluationary Microbiology*. 52:1881-1885.

- Holzappel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Björkroth, J. y Schillinger, U. (2001). Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl):365S–73S.
- Hugas, M. (1998). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. *Journal Meat Science*. 49: S139-S149.
- Hugas, M., Garriga, M., Aymerich, M.T. y Monfort, J.M. (1995). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in dry fermented sausage by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. *Journal of Applied Bacteriology*. 79: 322-330.
- Huggett, A.C. y Verschuren, P.M. (1996). The safety assurance of functional foods. *Nutrition Reviews*. 54:S132–S140.
- Huss, H.H., Jeppesen, V.F., Johansen, C. y Gram, L. (1995). Bioseparation of fish products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 4(2): 5-24.
- Iñiguez, P.C., Pérez, M.R. y Acedo, F.E. (2007). Evaluation of Probiotic properties in *Lactobacillus* isolated from small intestine of piglets. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 49(3-4):46-54.
- Jackson, T.C. Acuff, G.R. y Dickson, J.S. (1997). Meat, Poultry and Seafood. En Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. Editors Doyle, M.P., Beuchat, L.R. y Montville, T.J., Ed. ASM press, Washington D.C., E.U.A., pp: 13-79.
- Jacobsen, C. N., Nielsen, V. R., Hayford, A. E., Moller, P. L., Michaelsen, K. F., Paerregaard, A., Sandstrom, B., Tvede, M. y Jakobsen (1999). Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus spp.* by *in vitro*

- techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(11): 4949-4956.
- Jankovic, I., Ventura, M., Meylan, V., Rouvet, M., Elli, M. y Zink, R. (2003). Contribution of aggregation-promoting factor to maintenance of cell shape in *Lactobacillus gasseri* 4B2. *Journal of Bacteriology*. 185:3288-3296.
- Jin, L., Ho, Y., Abdullah, N. y Jalaludin, S. (1998). Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Letters in Applied Microbiology*. 27: 183-185.
- Kailasapathy, K. y J. Chin. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cells Biology*. 78: 80-88.
- Klaenhammer, T. R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70:337-349.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., Reuter, G., Holzapfel, W.H., Huis-in'-t-Veld, J.H.J., Persin, C., y Kasper, H. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 41: 103-125.
- Kmet, V., Callegari, M.L., Bottazzi, V. y Morelli, L. (1995). Aggregation-promoting factor in pig intestinal *Lactobacillus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 21:351-353.

- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J. y Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*. 94:981-987.
- Kyu, K., Kim, R. y Kim, S.H. (1998). Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature*. 394: 595-599.
- Larpent, J.P. (1995). Las bacterias lácticas En ICMSF: Microbiología Alimentaria. Vol. 2., Las fermentaciones alimentarias. Larpent, J.P. (Ed.). Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. pp. 3-17.
- Lawson, P. A., Llop, P. P., Hutson, R. A., Hippe, H. y Collins, M. D. (1993). Towards a phylogeny of the clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiology Letters*. 113(1): 87-92.
- Lee, J. y Kaletunc, G. (2002). Evaluation of heat inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* by differential scanning calorimetry. *Applied and Environmental Microbiology*. 93:178-189.
- Lee, Y.K. y Salminen, S. (1995). The coming of age of probiotics. *Trends Food Science Technology*. 6: 241-302.
- Leisner, J. J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi, A. y Tee, L. K. (2001). Identification of lactic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. *International Journal of Food Microbiology*. 63: 149-157.

- Leisner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 181-186.
- Lemus, C.B., Kaiser, A. y Montville, T.J. (1991). Inhibition of food borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Applied and Enviromental Microbiology*. 57(6):1683-1688.
- Li, X.J., Yue, L.Y., Guan, X.F. y Qiao, S. Y. (2008). The adhesion of putative probiotic *lactobacillus* to cultured epithelial cells and porcine intestinal. *Journal of Applied Microbiology*. 104(4):1082-1091.
- Lilly, D.N. y Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 147:747-748.
- Lücke, F.K. (1996). Lactic acid bacteria involved in food fermentation and their present and future use in food industry. In: *Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications*. T.F. Bozoglu and R. Bibek, Editors, *NATO ASI Series* vol. H98, Springer, Berlin, pp. 81–101.
- Lücke, F.K. (2000). Utilization of microbes to process and preserve meat. *Meat Science*. 56:105-115.
- Lyhs, U., Korkeala, H. y Björkroth, J. (2002). Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged gravid rainbow trout using ribotyping. *International Journal of Food Microbiology*. 72:147-153.

- Mac Faddin, J. F. (1991). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Mac Faddin, J. F. Editorial Médica Panamericana. México. Pp. 17-20.
- Macfarlane, G.T. y Cummings, H.J. (1999). Probiotics and Prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health?. *BMJ*. 318: 999-1003.
- Madigan, M., Martinko, J. y Parker, J. (2006). Brock. Biología de los microorganismos. Capítulo 20 En: Control del crecimiento microbiano, 10ª edición. Prentice Hall Iberia. Madrid, pp. 725-727.
- Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. y Tsakalidou, E. (2006). Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. . *International Dairy Journal*. 16: 189-199.
- Marceau, A., Zagorec, M. y Champomier, V. M.C. (2003). Positive effects of growth at suboptimal temperature and high salt concentration on long-term survival of *Lactobacillus sakei*. *Microbiology*. 154(1):37-42.
- Marshall, D.L., Bal'a, M.F.A. (2001). Microbiology of Meats. In: Meat Science and Applications. Hui, Y.H., Nip, W.-K., Rogers, R.W.; Young, O.A. (Editors). New York: Marcel Dekker, pp. 159-163.
- Milbourne, K. (1983). Thermal tolerance of *Lactobacillus viridescens* in ham. *Meat Science*. 9:113-119.

- Minor, P.H., Ponce, A.E., Macías, B.S. y Guerrero, L.I. (2002). Conservación de la carne fresca de cerdo por fermentación láctica. Efecto sobre el color, la textura y la formación de los ácido grasos libres. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 1(1-2):73-80.
- Mishra, V. y Prasad, M. N. (2005). Application of *in vitro* for selection of *Lactobacillus casei* strains as potencial probiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 103:109-115.
- Nataro, J.P., Koper, B.J., Robins, B.R., Prado, V., Vial, P. y Levine, M.L. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HE-p-2 cells. *Pediatric Infectious Diseases Journal*. 6: 829-831.
- Niamsup, P., Sujaya, I.N., Tanaka, M., Sone, T., Hanada, S., Kamagata, Y., Lumyoung, S., Assavanig, A., Asano, K., Tomita, F., Yokota, A. (2003). *Lactobacillus thermotolerans* sp. nov., a novel thermotolerant species isolated from chicken faeces. *International Journal of System Evolution Microbiology*. 53: 263-268.
- Nitisinprasert, S., Nilphai, V., Bunyun, P., Sukyai, P., Doi, K. y Sonomoto, K. (2000). Screening and identification of effective thermotolerant lactic acid bacteria producing antimicrobial activity against *Escherichia coli* and *Salmonella* sp. resistant to antibiotics. *Natural Science*. 34:387-400.

- Noriega, L., Cuevas, I., Margolles, A., de los Reyes, C. (2006). Deconjugation and bile salts hydrolase activity by *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to bile. *International Dairy Journal*. 16:850-855.
- Orla-Jensen, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria, Andr. Fred. Host & Son, KGL. Høghandel Ejnar Munksgaard, Copenhagen
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *International Dairy Journal*. 9: 43-52.
- Papamanoli, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki y Kotzekidou, P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Science*. 65:859-867.
- Parker, R.B. (1974). Probiotics: the other half of the antibiotic story. *Annals Nutrition Health*. 29:4-8.
- Pedersen, C., Jonsson, H., Lindberg, E. and Roos, S. (2004). Microbiological Characterization of Wet Wheat Distillers Grain, with Focus on Isolation of Lactobacilli with Potential as Probiotics. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3):1522-1527.
- Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, G. y Villani, F. (2004). Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausage for their potential use as probiotics. *Meat Science*. 67:309-317.

- Pennacchia, C., Vaughan, E.E. y Villani, F. (2006). Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausage: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Science* .73:90–101.
- Pérez, P.F., Minnaard, Y., Disalvo, E.A., De Antoni, G.L. (1998). Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*. 64:21-26.
- Pérez-Chabela, M.L., Guerrero, I. y Totosa, A. (2008). Thermotolerant lactic acid bacteria inoculation in cooked sausages. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 28: 132-138.
- Põtaja, E. (1991). Meat products made of coarsely ground meat: Survival of lactic acid bacteria and *Pseudomonas* after heat treatment. Proceedings of the 37th International *Congress of Meat Science and Technology*. Kulmbach, Germany. Pp. 4:19.
- Põtaja, E. (1992). Heat resistance of two streptococci isolated from the core of cooked meat products made from coarsely ground pork. Proceedings of the 38th International *Conference of Meat Science and Technology*, Clermont-Ferrand, Francia, pp. 723-725.
- Prescott, L.M., Harley, J. P. y Klein, D. A. (1999). Capitulo 3 Estructura y función de la célula procariota. En: Microbiología. Prescott, L.M., Harley, J. P. y Klein, D. A. 4^{ta} edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 37-72.

- Prescott, L.M., Harley, J., P. y Klein, D., A. (1999). Capítulo 6 En: Crecimiento microbiano. Microbiología. Prescott, L.M., Harley, J., P. y Klein, D., A. 4^{ta}. edición. Editorial McGraw Hill Interamericana. Madrid, España. pp. 115-136.
- Quintavalla, S. y Campanini, M (1991). Effect of rising temperature on the heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat emulsion. *Letters in Applied Microbiology*.12: 184-187.
- Quintero Salazar, B. (2001). Empleo de cultivos bioprotectores y nisina sobre la calidad microbiológica y ficoquímica de carne de pollo almacenada en condiciones de abuso de temperatura. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Ramírez Chavarrín, N.L. (2005). Utilización de bacterias lácticas termorresistentes para prolongar la vida útil de batidos cárnicos. Tesis de Maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.
- Rantsiou, K., Drosinos, E. H., Gialitaki, M., Urso, R., Krommer, J., Gasparik-Reichardt, J., Tóth, S., Metaxopoulos, I., Comi, G. y Cocolin, L. (2005). Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausage produced in Greece, Hungary and Italy. *Food Microbiology*. 22:19-28.

- Rashid, H., Togo, K., Ueda, M. y Miyamoto, T. (2007). Probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk 'Dahi' in Bangladesh. *Pakistan Journal of Nutrition*. 6 (6): 647-652.
- Reid, G.J., McCroarty, A., Amgotti, R. y Cook, R.L. (1988). *Lactobacillus* inhibitor production against *E. coli* and coaggregation ability with uropathogens. *Canadian Journal of Microbiology*. 34:344-351.
- Reniero, R., Cocconcelli, P., Bottazzi, V. y Morelli, L. (1992). High frequency of conjugation in *Lactobacillus* mediated by an aggregation-promoting factor. *Journal of General Microbiology*. 138:763:768.
- Requena, T. y Peláez, C. (1995). Revisión: Actividad antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 35 (1):19-44.
- Rodríguez, J. M., Martínez, M. I., Suárez, J. M., Martínez, J. M. y Hernández, P.E. (1997). Research note: Unsuitability of the MRS medium for the screening of hydrogen peroxide-producing lactic acid bacteria. *Letters Applied Microbiology*. 25:73-74.
- Rondón, A.J., Samaniego, L.M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M.J., Laurencio, M. y Pérez, M. (2008). Aislamiento, Identificación y Caracterización Parcial de las Propiedades Probióticas de Cepas de *Lactobacillus sp.* Procedentes del Tracto Gastrointestinal de Pollo de Ceba. *Ciencia y Tecnología de Alimentaria*. (61):56-63.

- Roy, D., Sirois, S. y Vicent, D. (2001). Molecular discrimination of lactobacilli used as starter and probiotic cultures by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Current Microbiology*. 42:282-289.
- Saarella, M., Hallamaa, K., Mattila-Sandholm, T. y Matto, J. (2003). The effect of lactulose lactitol and lactobionic acid on the functional and technological properties of potentially probiotic *Lactobacillus* strains. *International Dairy Journal*. 13: 291-302.
- Saarella, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. *Journal Biotechnology*. 84:197-215.
- Sachindra, N.N., Sakhare, P.Z., Yashoda, K.P. y Rao, D.N. (2005). Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*. 16(1):31-35.
- Sakala, R., M., Hayashidani, H., Kato, Y., Kaneuchi, C. y Ogawa, M. (2002). Isolation and characterization of *Lactococcus piscium* strains from vacuum-packaged refrigeration beef. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 173-179.
- Salim, G.A. y Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*. 76:138-146.

Sánchez, I., Seseña, S. y Palop, L. I. (2003). Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of Almagro eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *International Journal of Food Microbiology*. 28:181-189.

Santos, E.M., Jaime, I., Rovira, J., Lyhs, U., Korkeala, H. y Bjorkroth, J. (2005). Characterization and identification of lactic acid bacteria in "morcilla de Burgos". *Internatioanl Journal of Food Microbiology*. 97:285-296.

Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. y Mattila, S.T. (1998). Demonstration of safety of probiotics. *International of Journal Food Microbiology*. 44:93-106.

Schachtsiek, M., Hammes, W.P. y Hertel, C. (2004). Characterization of *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001T surface protein Cpf mediating coaggregation with and aggregation among pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(12):7078-85.

Schellenberg, J., Smoragiewicz, W. y Karska-Wysocki, B. (2006). A rapid method combining immunofluorescence and cytometry for improved understanding of competitive interactions between lactic acid bacteria (LAB) and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in mixed culture. *Journal of Microbiological Methods*. 65(1):1-9.

Schillinger, U. y Lucke, F. K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*. 55:1901-1906.

Comentado [JH1]:

Con formato: Sangría: Sangría francesa: 1.25 cm

Dio formato: Fuente: (Predeterminada) Tahoma, Cursiva

Dio formato: Fuente: (Predeterminada) Tahoma, Cursiva

Dio formato: Fuente: (Predeterminada) Tahoma, Cursiva

Dio formato: Fuente: (Predeterminada) Tahoma, Cursiva

Dio formato: Fuente: (Predeterminada) Tahoma, Inglés (Estados Unidos)

- Shah, N. P. (2000). Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. *Journal Dairy Science*. 83: 894-907.
- Sharpe, M.E. y Pettipher, G. L. (1983). Food spoilage by lactic acid bacteria. *Economic Microbiology*. 8: 199-223.
- Sherman, J. M. (1937). The streptococci. *Bacteriological Reviews*. 1: 3-97.
- Silla, S. H. (1992). Resistencia térmica bacteriana. Parámetros de medida y su control. *Alimentación, Equipos y Tecnología*. Pp. 57-61.
- Smith, H.W. y Linggood, M.A. (1971). Observations on the pathogenic properties of the K88, Hly and Ent plasmids of *Escherichia coli* with particular reference to porcine diarrhea. *Journal of Medical Microbiology*. 4:467-485.
- Sow, N.M., Dauphin, R.D., Roblain D, Guiro A.T. y Thonart P. (2005). Polyphasic identification of a new thermotolerant species of lactic acid bacteria isolated from chicken faeces. *African Journal of Biotechnology*. 4(5): 409-421.
- Stackebrandt, E. y Teuber, M. (1998). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70(3): 317-324.
- Stackebrandt, E., y Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species in bacteriology. *International Journal Systematic Bacteriology*. 44:846-849.

- Sthurland, J.P. y Varnam, A. (1982). Fresh meat processing. Chapter 4 in Meat Microbiology. M.H. Brown (editor). *Applied Science Publishers*, London, pp. 103-128.
- Stiles, M. E. y Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36(1): 1-29.
- Stiles, M.E. (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 70:235-249.
- Stumbo, C. R. (1973). Thermobacteriology. In: Food Processing. Stumbo, C. R. 2da edition. Academic Press, New York and London. pp. 88-90.
- Suskovic, J., Brkic, B., Maticic, S. y Maric, V. (1997). *Lactobacillus acidophilus* M92 as potential probiotic strain. *Milchwissenschaft*. 52:430-435.
- Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. y Dousset X. (1999). Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. *International Journal of Food Microbiology*. 48: 167-177.
- Todorov, S.D., Botes, M., Guigas, C., Schillinger, U., Wiid, I., Wachsman, M.B., Holzapfel, W.H. y Dicks, L.M.T. (2008). Boza a natural source of Probiotic lactic acid bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 104(2):465-477.
- Tomasik, P. J. y Tomasik, P. (2003). Probiotics and Prebiotics. *Cereal Chemistry*. 80(2): 113-117.

- Tramer, J. y Fowler, G.G. (1964). Estimation of nisin in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 5:522-528.
- Tuomola, E.M. y Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *International Journal of Food Microbiology*. 41:45-51.
- Työppönen, S., Penttjä, E. y Mattila, S. T. (2003). Bioprotectives and probiotics for dry sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 83: 233-244.
- Vaughan, E.E., de Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A. D. y de Vos, W.M. (2002). The intestinal LABs. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 82: 341-352.
- Victoria León, T., Totosa, A., Guerrero, I., Pérez-Chabela, M.L. (2006). Efecto de bacterias ácido lácticas termoresistentes en salchichas cocidas. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*. 5 (2): 135-141. ISSN: 1135-8122.
- Vidal, E.J., Canizález, R.A., Gutiérrez, J.J. y Navarro, G.F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*. 49(5):376-386.
- von Holy, A., Cloete, T.A. y Dykes, G.A. (1991). Quantification and characterization of microbial populations associated with spoil, vacuum packed Vienna sausages. *Food Microbiology*. 8(2):95-104.

- Waterman, S. y Small, P. (1998). Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 64: 3882-3886.
- Wirth, F. (1992). Capítulo 9 en: Tratamiento de calor- conservabilidad En: Tecnología de los embutidos escaldados. Wirth, F. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza, España. pp. 171-190.
- Yang, R. y Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*. 11(4):281-291.
- Yuki, N., Shimazaki, T., Kushiro, A., Watanabe, K., Uchida, K., Yuyama, T. y Morotomi, M. (2000). Colonization of the Stratified Squamous Epithelium of the Nonsecreting Area of Horse Stomach by Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(11): 5030-5034.
- Ziemer, C.J. y Gibson, G.R. (1998). An overview of probiotics, prebiotics and synbiotics in the functional food concept: perspectives and future strategies. *International Dairy Journal*. 8:473-479.