

# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOLOGÍA

Actividad proteolítica y antifúngica de *Lactobacillus* sp.



Celia Álvarez Fernández

Departamento de Tecnología y  
Biotecnología de Productos Lácteos.  
Instituto de Productos Lácteos de Asturias  
(IPLA-CSIC) / Departamento de Biología  
Funcional. Área de microbiología  
(Universidad de Oviedo)

Julio/2018



UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA



## Resumen.

Durante los últimos años el público ha comenzado a exigir alimentos con menos sustancias artificiales, lo que ha provocado que la industria alimentaria se vea obligada a desarrollar y utilizar conservantes más naturales. Por ello, han comenzado a investigar las bases científicas detrás de la longevidad de productos fermentados, concluyendo que bacterias del género *Lactobacillus*, son las candidatas para convertirse en los conservantes del futuro. El objetivo de este trabajo fin de grado es comprobar si la actividad antimicrobiana demostrada en condiciones de laboratorio de nueve cepas de *Lactobacillus* aisladas de alimentos vegetales fermentados andinos, podría extrapolarse a un alimento de origen vegetal como una papilla nutricional compuesta de harina de maíz, soja y leche descremada. Se comparó el crecimiento, metabolismo y actividad proteolítica de estas cepas en el sustrato, destacando *L. plantarum* CECT 8962 y CECT 8493 como principales cepas acidificantes. No se detectó actividad antibacteriana en la fracción acuosa de la papilla nutricional fermentada 24 h. Sin embargo, mediante ensayos directos *in situ*, como co-cultivos bacteria-hongo y de post-contaminación de la papilla nutricional fermentada por los lactobacilos, se demostró que ambas cepas ralentizan el crecimiento de cepas fúngicas como *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* CECT 2094, *Penicillium expansum* CECT 2278, *A. parasiticus* CECT 2681 y *Gibberella moniliformis* CECT 2987, en menor y mayor medida, siendo *L. plantarum* CECT 8962 la cepa más activa, sustentando su posible uso industrial como conservante alimenticio.

## Abstract.

In recent years, the public has begun to demand food with fewer artificial substances which has forced the food industry to develop and use natural preservatives. Therefore, they have begun to investigate the scientific basis behind the longevity of fermented products, concluding that bacteria of the genus *Lactobacillus*, are the candidates to become the preservatives of the future. The aim of this Degree Thesis is to verify if the antimicrobial activity demonstrated in laboratory conditions of nine strains of *Lactobacillus* isolated from Andean fermented vegetable foods, could be extrapolated to a food substrate of vegetable origin as a nutritional porridge composed of corn flour, soy and skim milk. The growth, metabolism and proteolytic activity of these strains were compared in the substrate, highlighting *L. plantarum* CECT 8962 and CECT 8493 as the main acidifying strains. No antibacterial activity was detected in the aqueous fraction of the 24 h fermented nutritional porridge. However, direct *in situ* assays, such as bacteria-fungi co-cultures and post-contamination trials of the nutritional porridge fermented by lactobacilli, showed that these strains slow down the growth of fungal strains such as *Aspergillus oryzae* var. *oryzae* CECT 2094, *Penicillium expansum* CECT 2278, *A. parasiticus* CECT 2681 and *Gibberella moniliformis* CECT 2987, to a lesser and greater extent, being *L. plantarum* CECT 8962 the most active one, supporting its possible industrial use as a food preservative.

# Índice

1.	Introducción y objetivo.....	3
2.	Materiales y métodos .....	5
A.	Microorganismos y condiciones de cultivo. ....	5
B.	Medios de cultivo, reactivos y programas utilizados.....	7
C.	Fermentación de 24 h de la papilla nutricional.....	7
I.	Medición del pH.....	7
II.	Recuentos microbiológicos.....	7
III.	Identificación por secuenciación parcial del ADNr 16S.....	8
D.	Obtención y análisis de la fase acuosa de la papilla fermentada.....	8
I.	Ensayo OPA .....	9
II.	Estudio del perfil proteico de la fase acuosa.....	10
III.	Cuantificación de ácidos orgánicos.....	10
IV.	Estudio de la actividad antagonista.....	11
V.	Ensayo de actividades antifúngicas <i>in situ</i> .....	12
3.	Resultados y discusión.....	13
A.	Crecimiento de las cepas de <i>Lactobacillus</i> en la papilla nutricional.....	13
B.	Estudio de la actividad proteolítica.....	16
C.	Cuantificación de ácidos orgánicos mediante HPLC.....	17
D.	Análisis de la actividad antagonista.....	18
I.	Test de difusión en agar .....	19
II.	Actividades antifúngicas <i>in situ</i> .....	19
4.	Conclusión.....	25
5.	Referencias .....	26

# 1. Introducción y objetivo

Uno de los grandes retos a los que se tiene que enfrentar la industria alimentaria actualmente es evitar el deterioro de los alimentos, provocado por el crecimiento de bacterias y hongos. Además, deben hacerlo utilizando productos de origen natural, ya que los consumidores han comenzado a expresar un rechazo hacia los productos que contienen conservantes artificiales (Axel et al., 2016).

Las bacterias del ácido láctico (BAL) están presentes en la mayoría de los productos fermentados, contribuyendo tanto al aumento del valor nutricional como a la calidad de alimentos y bebidas. Además, presentan dos propiedades muy explotadas actualmente, la primera es su uso como probiótico, ya que se ha comprobado que algunas son capaces de estimular al sistema inmune. La segunda es que presentan actividad antimicrobiana, siendo una de las fuentes de sustancias antifúngicas y antibacterianas más potentes conocidas por los seres humanos, lo que las ha convertido en la respuesta a la búsqueda de conservantes naturales (Gajbhiye & Kapadnis, 2016; Turpin et al., 2018).

Las BAL están clasificadas como “Generally Regarded As Safe” (GRAS) por “Food and Drug Administration” (FDA) en Estados Unidos, y muchas tienen el reconocimiento de “Qualified Presumption of Safety” (QPS) en la Unión Europea. Engloban los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Mlissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*. Aunque constituyen un grupo heterogéneo todas ellas comparten las siguientes características: son bacterias Gram positivas, no forman esporas, aerotolerantes, inmóviles y con morfología de coco o bacilo (Crowley et al., 2013). Este grupo presenta homo- y heterofermentación de la glucosa, siendo el producto principal de su metabolismo el ácido láctico, utilizan un rango muy amplio de azúcares a parte de la glucosa y sus temperaturas óptimas de crecimiento van desde los 10°C hasta los 45°C (Gajbhiye & Kapadnis, 2016).

Se ha comprobado que tienen actividad antifúngica, la cual se debe al sinergismo entre el amplio rango de compuestos con capacidad antifúngica que producen y el descenso del pH, debido a la producción de ácidos orgánicos (Axel et al., 2016). Diversas especies del género *Lactobacillus*, en especial *L. plantarum*, son los principales productores de sustancias que inhiben el crecimiento de hongos como *Aspergillus*, *Penicillium* y *Gibberella* (Zhao et al., 2017; Gajbhiye & Kapadnis, 2016). Entre los compuestos que producen destacan los ácidos orgánicos, como el ácido láctico, feniláctico, acético o propiónico. Estos ácidos interfieren en el metabolismo fúngico, inhibiendo la actividad enzimática, además de causar la disrupción de la membrana celular. Sin embargo, el descenso del pH no es suficiente para detener el crecimiento de los hongos, ya que existen muchos géneros como *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium*, *Meyerozyma*, *Candida*, *Rhodotorula* y *Yarrowia spp* que son ácido-tolerantes (Lačanin et al., 2017). También producen péptidos de pequeño tamaño y dipéptidos cíclicos, además de peróxido de oxígeno, debido a la presencia de la enzima flavoprotein oxidasa, y reuterina, derivada

del metabolismo del glicerol, cuya presencia previene el crecimiento de los hongos (Crowley et al., 2013; Gajbhiye & Kapadnis, 2016).

La relevancia de esta actividad antifúngica se debe a que el reino Fungi engloba desde organismos eucariotas pluricelulares hasta unicelulares como levaduras y mohos, que son los principales contaminantes de alimentos produciendo pérdidas económicas importantes (Ribes et al., 2017). Esto se debe a que este grupo es capaz de crecer en un rango de sustratos y condiciones ambientales muy diversas y puede formar esporas, haciendo que su eliminación sea muy difícil (Pawłowska et al., 2012).

Por otro lado, su crecimiento provoca la pérdida de la calidad del alimento y el enrarecimiento de su sabor, además de su descomposición y el acortamiento de su vida útil (Yépez et al., 2017), aunque la principal preocupación es que algunos hongos tienen capacidad de producir micotoxinas (Russo et al., 2017). Estas sustancias constituyen un riesgo para la salud humana, siendo más peligrosas que los contaminantes sintéticos, toxinas de origen vegetal, aditivos alimentarios o residuos de pesticidas, llegando a ocasionar cáncer, supresión del sistema inmune y daños severos en diversos órganos como los riñones (Pawłowska et al., 2012). Especies como *Aspergillus parasiticus*, *Gibberella moniliformis* (antes *Fusarium verticilloides*) y *Penicillium expansum*, son los principales productores de estas toxinas en alimentos (Yépez et al., 2017).

En concreto, *Gibberella moniliformis* es responsable de producir un determinado tipo de micotoxinas llamadas tricotecenos, las cuales llegan a ocasionar en humanos serios problemas de salud como hemorragias. Además, estas toxinas son resistentes a los tratamientos convencionales, lo que ha impulsado la búsqueda de otros métodos que eliminen estas sustancias o que impidan que su producción por el hongo (Zhao et al., 2017).

Como mencioné anteriormente, el género *Lactobacillus* también tiene actividad antibacteriana, de hecho, se ha visto como algunas cepas son capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi y *Listeria innocua* (Yépez et al., 2017). Muchos de los compuestos antifúngicos también tienen actividad antibacteriana, la cual se complementa con otros antibióticos como la reuteriicina o bacteriocinas como la nisina (Pawłowska et al., 2012).

Una de las estrategias más utilizadas para evitar que tanto hongos como bacterias deterioren alimentos y bebidas, es la incorporación de las BAL de manera deliberada en la cadena de producción (Zhao et al., 2017). Añadir directamente las bacterias tiene la ventaja de que los compuestos se están produciendo *in situ*, de forma que se puede reducir el uso de conservantes químicos (Axel et al., 2016).

Concretamente, los lactobacilos se han añadido a masas compuestas por harinas de distintos cereales que luego fermentan, como la del pan, con el objetivo de evitar el crecimiento de hongos que arruinen el producto. Además, estas bacterias contribuyen a mejorar la calidad del producto, tanto su sabor y apariencia como a aumentar sus valores nutricionales (Pawłowska et al., 2012). Por otro lado, las BAL consumen los aminoácidos, vitaminas y otros elementos para desarrollarse y poseen complejos

sistemas proteolíticos con gran variedad de peptidasas intracelulares, las cuales en su conjunto les permiten el transporte y degradación de proteínas y péptidos de estas masas (Dallagnol et al., 2013).

En el 2017, el equipo conformado por Alba Yépez, Carlos Luz, Giuseppe Meca, Graciela Vignolo, Jordi Mañes y Rosa Aznar, (Yépez et al., 2017) estudió las posibles actividades antimicrobianas de cepas aisladas del tocosh y de la chicha, dos alimentos vegetales fermentados de origen latinoamericano, pertenecientes a las siguientes especies, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. farciminis*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. sakei*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Pediococcus pentosaceus*.

Llevaron a cabo dos tipos de ensayos, uno de inhibición directa, en el que se realizaron co-cultivos de las cepas aisladas, y otro de inhibición indirecta en el que se utilizó el sobrenadante obtenido de una fermentación de 18h. Comprobaron que algunas de las cepas aisladas del Tocosh y de la Chicha, cultivadas en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe), inhibían el crecimiento de hongos como *Penicillium expansum*, *P. roqueforti*, *Aspergillus oryzae*, *A. parasiticus*, *A. niger*, *Gibberella moniliformis* y *Meyerozyma guilliermondii* o bacterias como *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi y *Listeria innocua* (Yépez et al., 2017).

En base a lo expuesto anteriormente, los objetivos de este trabajo fin de grado pueden resumirse en dos. El primero es comprobar si los resultados obtenidos por Yépez et al (2017) se repiten al realizar estos ensayos de inhibición directa e indirecta, cuando las cepas de *Lactobacillus* fermentan una papilla nutricional, ya que constituye una situación más próxima a la realidad de la industria alimenticia. El segundo, consistió en realizar una prueba preliminar para sustentar investigaciones posteriores que permitan explorar las posibles actividades antifúngicas en situaciones de post-contaminación durante el almacenamiento de los productos fermentados.

## 2. Materiales y métodos

### A. Microorganismos y condiciones de cultivo.

Los lactobacilos fueron cultivados de forma rutinaria en MRS antes de ser inoculadas en la papilla nutricional. Todas las cepas de microorganismos utilizados en este trabajo, así como las condiciones de cultivo, se describen en la Tabla 1.

Tabla 1. Listado de las especies bacterianas y fúngicas utilizadas.

Especie	Código	Medio de cultivo	Temperatura	Observaciones
<i>Lactobacillus fermentum</i>	CECT 9269	MRS	30°C	Fermentación en la papilla nutricional
<i>L. plantarum</i>	CECT 8962			
<i>L. plantarum</i>	CECT 8965			
<i>L. plantarum</i>	CECT 8963			
<i>L. plantarum</i>	CECT 8964			

Especie	Código	Medio de cultivo	Temperatura	Observaciones
<i>L. plantarum</i>	CECT 8966			
<i>L. plantarum</i>	CECT 8493			
<i>L. plantarum</i>	CECT 8493			
<i>L. sakei</i>	CECT 9267			
<i>Micrococcus luteus</i>	NCIMB 8166	Hidrolizado de caseína de soja (TSB)	37°C	Estudio del antagonismo bacteriano
<i>Listeria innocua</i>	CECT 910	TSB	30°C	
<i>Lactobacillus sakei</i>	CECT 906	MRS	30°C	
<i>Escherichia coli</i>	DH10B	TSB	37°C	
<i>Lactococcus lactis</i>	MG 1614	M17 + glucosa	30°C	
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i>	CECT 2094	Caldo de extracto de Malta	25°C	Estudio del antagonismo fúngico
<i>Penicillium expansum</i>	CECT 2278			
<i>Aspergillus parasiticus</i>	CECT 2681			
<i>Gibberella moniliformis</i>	CECT 2987			

Los códigos de identificación hacen referencia a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), España, "National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria" (NCIMB), Reino Unido, y la colección propia del Instituto de Productos Lácteos de Asturias perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), España, (MG). DH10B fue adquirido de ThermoFisher Scientific.

Las especies fúngicas utilizadas en el estudio del antagonismo fúngico, (ver Tabla 1), fueron suministradas como liófilos, por lo que en un primer momento se activaron dejándolas durante 30 min en 0,4 mL caldo de extracto de Malta (Scharlau) a temperatura ambiente. A continuación, se repartió todo el volumen en 3 placas de caldo de extracto de Malta al 2% de agar, mediante siembra en superficie. Se dejaron incubar durante 5 días a 25°C.

Con la ayuda de hisopos se recogieron las esporas que se resuspendieron en 1,5 mL agua de peptona tamponada (APT). Se sembraron 100 µL de cada suspensión en caldo de extracto de Malta al 2% de agar mediante siembra en superficie, y se dejaron incubar a 25°C hasta conseguir un buen crecimiento y esporulación.

Transcurrido este tiempo, se recogieron las esporas de la misma forma, pero esta vez se resuspendieron en APT al 0,1% Tween 80 y se dejó reposar la suspensión durante 5 min, para que los posibles restos de micelio precipitasen.

Se midió la densidad óptica a 600 nm (DO600) de cada suspensión, y se sembraron distintas diluciones para calcular el número de esporas/mL en placas de caldo de extracto de Malta al 2% de agar, se dejaron incubar a 25°C durante 56 h aproximadamente.

Las suspensiones de esporas se guardaron a 4°C hasta su uso.

## B. Medios de cultivo, reactivos y programas utilizados

El medio MRS y la leche descremada fueron proporcionados por Difco, el caldo de extracto de Malta y el TSB por Scharlau, el APT por Cultimed, el Tween80 por Duchefe, el reactivo completo OPA por Sigma-Aldrich, la glicina por Panreac, las harinas por el Granero integral, el medio selectivo Yeast Glucose Chloranphenicol agar (YGC) y la solución Ringer por Merck.

Todos los cálculos no estadísticos se realizaron con Excel.

Los cálculos estadísticos se realizaron con GraphPad versión 5 para Windows.

## C. Fermentación de 24 h de la papilla nutricional

La papilla nutricional está compuesta por un 60% de harina de maíz, un 20% de leche descremada en polvo y un 15% de harina de soja. Se prepararon 250 mL, siguiendo la proporción de 30 g de sólido en 200 mL de agua destilada. Se trató térmicamente, dejando la mezcla a 95°C en un baño de agua durante 10 min agitando cada dos min.

Después de incubar previamente los lactobacilos en MRS durante 24 h, se inocularon 40 mL de la papilla con aproximadamente  $10^7$  unidades formadoras de colonias (ufc) por mL y se dejaron en una noria incubando a 30°C 24 h. Esta fermentación se realizó por duplicado.

### I. Medición del pH

El pH se midió a las cero, 15 y 24 h desde el comienzo de la fermentación con un pH-metro (MicroPH 2001, Crison).

El pH se expresó como un incremento calculado con la siguiente fórmula.

$$\Delta pH = pH_{final} - pH_{inicial}$$

### II. Recuentos microbiológicos

Para calcular las ufc/mL al inicio del experimento, se tomaron 100  $\mu$ L de muestra y se hicieron diluciones seriadas en Ringer. A continuación, se sembraron, en placas de MRS al 2% de agar, 30  $\mu$ L (6 gotas de 5  $\mu$ L) de la dilución  $10^{-1}$  del control, que es papilla sin inocular, y de las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-4}$  de las papillas. A las 24 h de fermentación, se sembraron en el mismo medio las diluciones  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  del control y la  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  de las papillas inoculadas. Para calcular las ufc/mL se utilizó la siguiente fórmula.

$$ufc/ml = \frac{\text{Número de colonias}}{\text{Volumen}(ml)} \times \frac{1}{10^{\text{Dilución}}}$$

Número de colonias: es la media de las colonias contadas de un replicado biológico.

Volumen: es el volumen de muestra depositado en la placa.

Dilución decimal correspondiente.

### III. Identificación por secuenciación parcial del ADNr 16S

En los recuentos de 24 h, la papilla sin inocular que conformaba el control negativo estaba contaminada. Tras recoger una muestra, se identificó el contaminante por su morfología mediante microscopía óptica y mediante la secuenciación parcial del gen que codifica el ARNr 16S (ADNr 16S).

En primer lugar, se resuspendieron 0,5 mL del cultivo en 20 µL de SDS al 25% y NaOH 50 mM. Se incubó a 95°C durante 5 min. A continuación, se añadieron 180 µL de agua, se agitó y se centrifugó a 13.000 rpm durante 5 min. Del sobrenadante se tomó una alícuota que se utilizó como templado para la amplificación parcial del ADNr 16S con los siguientes primers específicos para eubacterias 27FYM (forward) AGAGTTTGATYMTGGCTCAG y 1492R' (reverse) GGTTACCTTGTTACGACTT. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50 µL, con Taq polimerasa (Ampliqon). El programa de amplificación consistió en 5 min a 95°C para desnaturalizar, 30 ciclos a 95°C (45 seg), 58°C (1 min) y 72°C (45 seg), y un último paso a 72°C durante 10 min.

El producto de PCR se envió a GATC Biotech en Alemania para su secuenciación. La secuencia resultante de la PCR se analizó con la herramienta online NCBI BLASTN (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y se utilizó la base de datos de ADN ribosomal 16S de bacterias y arqueas (Zhang et al., 2000).

### D. Obtención, análisis y uso de la fase acuosa de la papilla fermentada

La papilla sin inocular (que constituyó la referencia), la papilla inoculada con las distintas cepas de *Lactobacillus* e incubada durante 24 h, y el control negativo (papilla sin inocular incubada 24 h) fueron centrifugadas a 10.000 rpm durante 30 min, con el objetivo de obtener el sobrenadante o fase acuosa, que se someterá a distintas pruebas para determinar el grado de proteólisis mediante la cuantificación de aminoácidos y péptidos de pequeño tamaño, la producción de ácidos orgánicos, el estudio de su perfil proteico y la presencia de moléculas con actividad antagonista (ver Figura 1).

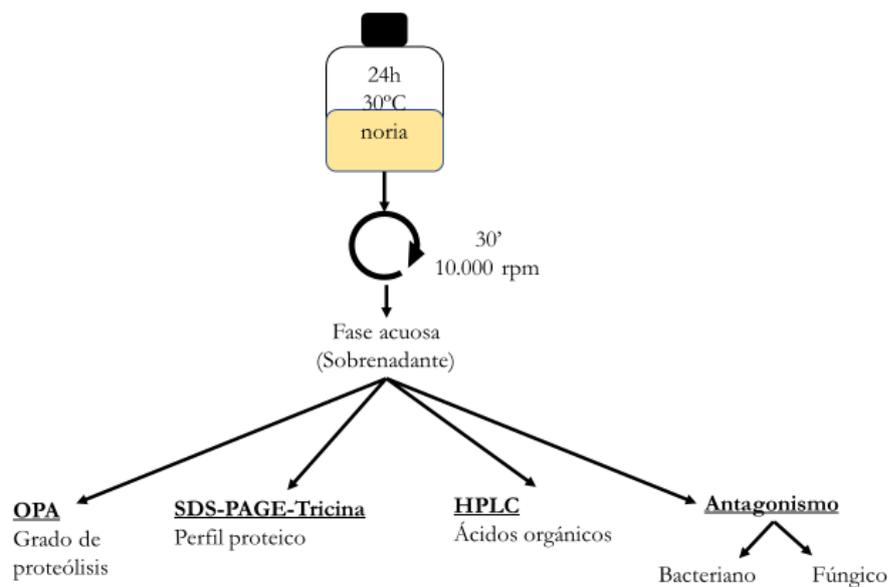


Figura 1. Obtención, análisis y uso del sobrenadante obtenido de la fermentación de 24 h

### I. Ensayo OPA

La reacción del O-Ftalaldialdehído y el grupo tiol del 2-mercaptoetanol con las aminas primarias presentes en aminoácidos y péptidos, da lugar a derivados fluorogénicos capaces de ser detectados mediante absorbancia a 340 nm, cuantificando de esta manera la concentración de estos péptidos y aminoácidos. (Jones et al., 1981; Simons & Johnson, 1977)

Antes de llevar a cabo el ensayo se realizó una desproteneización de las fases acuosas para eliminar proteínas y péptidos de gran y mediano tamaño con ácido tricloroacético (TCA) 0,72 N. Se tomó una alícuota de las fases acuosas y se centrifugó durante 15 min a 14.000 rpm. A continuación, se añadió 1 mL de TCA 0,72 N por cada 0,5 mL de sobrenadante, tras cinco min a temperatura ambiente la mezcla se centrifugó 15 min a 14.000 rpm. Este protocolo es una modificación del propuesto por Church y colaboradores (Church et al., 1983).

Para la cuantificación se elaboró una curva de calibración con glicina, con un rango de concentraciones de 1 mM a 10 mM.

En una placa de microtítulo se dispusieron 10  $\mu$ L del sobrenadante tratado con TCA, de las distintas concentraciones de glicina y de agua que conformó el blanco. A todo ello se le añadieron 200  $\mu$ L del reactivo OPA y, tras dos min, se midió la absorbancia a 340 nm en un lector de placas de microtítulo (Benchmark Plus, BioRads).

Para poder determinar si existen diferencias del grado de proteólisis entre las distintas cepas, se analizaron estadísticamente las concentraciones de aminoácidos y péptidos (expresados en mM de glicina) con el programa GraphPad Prism. Se analizaron con el test ANOVA y un post-test, el test de Tukey de múltiples comparaciones. El primero compara las medias de las distintas cepas

asumiendo que los datos siguen una distribución normal o próxima a esta. El segundo compara la media de cada cepa de dos en dos (GraphPad Software, n.d.).

## II. Estudio del perfil proteico de la fase acuosa

Para ello se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS) y tricina (SDS-PAGE-Tricina). Al igual que la SDS-PAGE convencional, el objetivo es el de separar proteínas de acuerdo con sus masas moleculares mediante un gel de poliacrilamida y en condiciones desnaturizantes, utilizando SDS como agente desnaturizador. Al aplicar una corriente eléctrica las proteínas de menos tamaño se desplazarán más rápido y viceversa (Nelson & Cox, 2013). La diferencia que presentan estos geles con tricina es su resolución, ya que resuelven proteínas más pequeñas de 20 a 3 kDa (Schägger, 2006).

La electroforesis se llevó a cabo en geles de SDS-PAGE-Tricina al 22% de Acrilamida/Bisacrilamida, según el protocolo de Schägger & von Jagow (1987). Tanto el gel concentrador (en donde las muestras se concentran) como el separador (en el cual se van a separar) se dejaron polimerizar juntos tras la adición del persulfato amónico (APS) y del N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED), los cuales siempre se añaden los últimos y por este orden, ya que una vez añadidos comienza la reacción de polimerización (Schägger & von Jagow, 1987).

La fase acuosa de la papilla fermentada durante 24 h se filtró con un filtro de papel (Whatman, nº1, 90 mm Ø), para eliminar las partículas en suspensión. A continuación, se neutralizó con NaOH 2 N y se esterilizó por filtración mediante filtros de acetato de celulosa (Whatman, FP 30/0,45 CA-S, 0.45 µm Ø). Por último, se desproteinizó centrifugando con centrífugas con un tamaño de corte de 3 kDa ("Amicon-ultra" de Millipore), 30 min a 7000 rpm.

Con este paso los componentes de la muestra se separaron según su peso molecular, obteniéndose una fracción cuyas moléculas no superan los 3 kDa y otra cuyas moléculas sí los superan. Para este análisis se utilizó la fracción mayor de 3 kDa.

Se mezclaron 15 µL de muestra con 5 µL del tampón de carga (4x: TrisHCl 200 mM, pH 6.8, SDS 8%, DTT 400 mM, glicerol 40% y azul de bromofenol 0.4%) (Schägger & von Jagow, 1987) y se hirvieron a 100°C durante 10 min. Después se cargaron 7 µL en cada pocillo. Como referencia se utilizó el marcador de pesos moleculares Low Range Rainbow RPN755E (GE Healthcare).

La electroforesis se realizó a 150 V durante 90 min, trascurrido ese tiempo se dejan teñiendo en la solución de tinte (Comasie R250 0,1%, ácido acético 7,5%, metanol 50%) durante 40 min, por último, se deja en la solución de destinte (metanol 10%, ácido acético 7,5%) (Schägger & von Jagow, 1987).

## III. Cuantificación de ácidos orgánicos

Se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

La técnica de cromatografía líquida se basa en la disolución de la muestra en una fase móvil, que luego se hace pasar a través de una fase estacionaria. La velocidad con la que cada una de las distintas moléculas recorre esta fase es única y la característica determinante para su identificación (García-Segura, 1999).

La técnica de HPLC se diferencia de las cromatografías líquidas clásicas en que se lleva a cabo a mayor presión, temperatura y velocidad, con fases móviles y estacionarias distintas. Además, incorpora un espectrofotómetro, optimizando la sensibilidad de detección y la selectividad (García-Segura, 1999).

Las muestras que fueron utilizadas para el análisis mediante HPLC se trataron de la misma forma que las que se utilizaron para el ensayo OPA (ver Ensayo OPA). Además, se centrifugaron durante 10 min a 14.000 rpm y se filtraron 300 µl con un filtro de jeringuilla (VWR, PTFE, 0,45 µm Ø), se pasaron al vial de cromatografía y se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se empleó una columna ICsep ICE-ION-300, a 65°C, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 8,5 mN como eluyente, flujo de 0,4 ml/min. Los detectores utilizados fueron los siguientes: 996 Photodiode Array Detector (210 y 280nm) y Differential Refractometer (410nm), a 35°C.

Los datos de concentración de ácidos orgánicos fueron procesados y analizados estadísticamente con el programa GraphPad Prism. Se analizaron con el test ANOVA y un post-test, el test de Tukey de múltiples comparaciones.

#### IV. Estudio de la actividad antagonista

Los ensayos de antagonismo se realizaron mediante un test de difusión en agar. Esta prueba consiste en preparar placas inoculadas con las cepas indicadoras, hacer pocillos en el medio solidificado y dejar en ellos una cierta cantidad de la muestra, en este caso la fase acuosa obtenida a partir de la papilla fermentada. La muestra difundirá a través del agar, y si posee actividad antagonista, se observará un halo de inhibición del crecimiento de la cepa indicadora. Midiendo el halo tenemos una indicación de su potencia como agente antagonista (Zhao et al., 2017).

La fase acuosa (ver Figura 1) se filtró con un filtro de papel (Whatman, n°1, 90mm Ø), para eliminar las partículas en suspensión. El filtrado se dividió en dos partes, de las cuales una mitad se neutralizó con NaOH 2N. Ambas fases acuosas se esterilizaron por filtración mediante filtros de acetato de celulosa (Whatman, FP 30/0,45 CA-S, 0.45 µm Ø) antes de ser utilizadas en el ensayo.

Para el ensayo de antagonismo bacteriano, 100 µL de cultivos de 24 h de las cepas indicadoras (ver Tabla 1) se inocularon en profundidad en 100 mL de su medio correspondiente (ver Tabla 1). Tras la solidificación del medio, se horadaron pocillos de 4 mm de diámetro a aproximadamente. En su interior se dejan 40 µL del sobrenadante.

Cada cepa indicadora se incubó a su temperatura correspondiente (ver Tabla 1) hasta que se observó un buen crecimiento bacteriano.

Para el ensayo de antagonismo fúngico, se preparó una suspensión con una concentración de  $10^4$  esporas/mL a partir del stock de esporas (ver Tabla 1) guardadas previamente a  $4^{\circ}\text{C}$ . De esta nueva suspensión, se sembraron en superficie,  $250\ \mu\text{L}$  en caldo de extracto de Malta al 2% de agar. Una vez seca la placa se horadaron pocillos con una pajita de 6 mm de diámetro, en los que se depositaron  $150\ \mu\text{L}$  de las fases acuosas.

Las placas se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$ , hasta que se observó un buen crecimiento del micelio del hongo.

### E. Ensayo de actividades antifúngicas *in situ*

Antes de llevar a cabo estos ensayos, se estudió el comportamiento de las cuatro cepas fúngicas en la papilla, para determinar el número óptimo de esporas con el cual se puede ver un buen crecimiento del hongo al cabo de tres días máximo.

Se preparó la papilla como se explicó anteriormente, y se repartió 2 mL de esta en placas de microtítulo de 24 pocillos. Cada pocillo se inoculó en superficie con 1000, 500, 100, 50, 10 y tres esporas por duplicado, y se dejaron dos pocillos sin inocular. Las placas se incubaron a  $25^{\circ}\text{C}$  y se observó su crecimiento durante 3 días.

Para los ensayos *in situ* de co-cultivo, post-contaminación y control ambiental (ver Figura 2), se repartieron 2 mL de la papilla en las placas de microtítulo.

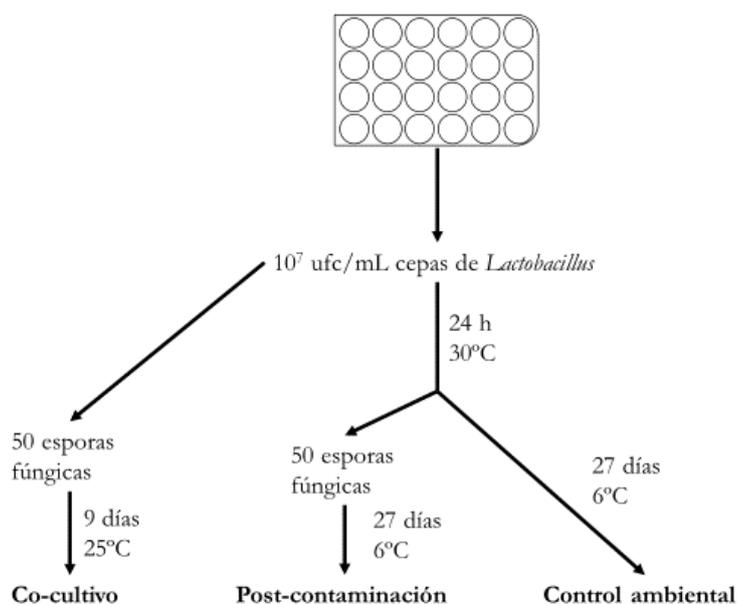


Figura 2. Planteamiento del experimento para observar el comportamiento del hongo y los *Lactobacillus* en la papilla nutricional

Para los ensayos de co-cultivos, se inocularon los 2 mL de papilla con  $10^7$  ufc/mL de las distintas cepas de *Lactobacillus* por duplicado, y a continuación, se añadieron a cada pocillo 50 esporas de los hongos en estudio. En cada placa, tres pocillos se dejaron sin inocular, conformando un control negativo. Se incubaron a 25°C durante 9 días.

En los ensayos de post-contaminación, se inocularon los lactobacilos en la papilla de la misma manera que en los co-cultivos y las placas se incubaron durante 24 h a 30°C. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50 esporas por pocillo de los hongos y se almacenaron durante 1 mes a 6°C. Y al igual que en el anterior ensayo tres pocillos se inocularon conformando un control negativo.

Como control ambiental, se inoculó una última placa solo con las cepas de *Lactobacillus*, sin contaminar por ninguno de los hongos. La placa se dejó incubar durante 24 h a 30°C y después se almacenó durante 1 mes a 6°C. A las 48 h de inocular los *Lactobacillus* en el control ambiental, se tomaron 100 µL de cada pocillo y de tres controles para identificar un posible contaminante. Con dicha alícuota se realizaron diluciones seriadas en Ringer y se sembraron 100 µL en placas de YGC, se incubaron a 25°C durante cuatro días

Al cabo de 1 mes a 6°C, se realizan recuentos selectivos de las placas de post-contaminación, para hongos y levaduras en el medio YGC. Para ello, se tomó una alícuota y se realizaron diluciones seriadas en APT, que se sembraron en superficie. Las placas se incubaron a 25°C durante 72 h.

Los resultados de los recuentos microbiológicos se analizaron estadísticamente el programa GraphPad Prism, en concreto con el test ANOVA y el post-test de Tukey de múltiples comparaciones, para determinar si el crecimiento del hongo cuando crece solo es significativamente distinto a cuando crece junto a una cepa de *Lactobacillus*.

### 3. Resultados y discusión

El objetivo de este trabajo fin de grado es comprobar si las premisas establecidas en el trabajo de Yépez et al (2017), sobre el potencial antimicrobiano de cepas de *Lactobacillus* en condiciones de laboratorio, son extrapolables a un sustrato más complejo como una papilla nutricional. Para ello, se procedió a comprobar la actividad inhibitoria de estas cepas una vez crecidas en la papilla y, además, se evaluó la inhibición de hongos *in situ* en co-cultivos bacteria-hongo y en un ensayo de post-contaminación, tras cultivar las cepas de *Lactobacillus* en la papilla nutricional.

#### A. Crecimiento de las cepas de *Lactobacillus* en la papilla nutricional

En primer lugar, se realizó una fermentación en la papilla nutricional con las nueve cepas de *Lactobacillus*, las cuales se dejaron incubar 24 h a 30°C. Durante ese periodo de tiempo se realizaron recuentos microbiológicos a las cero y a las 24 h desde el inicio del experimento, y también se midió el pH a las 15 y a las 24 h desde el comienzo de la incubación.

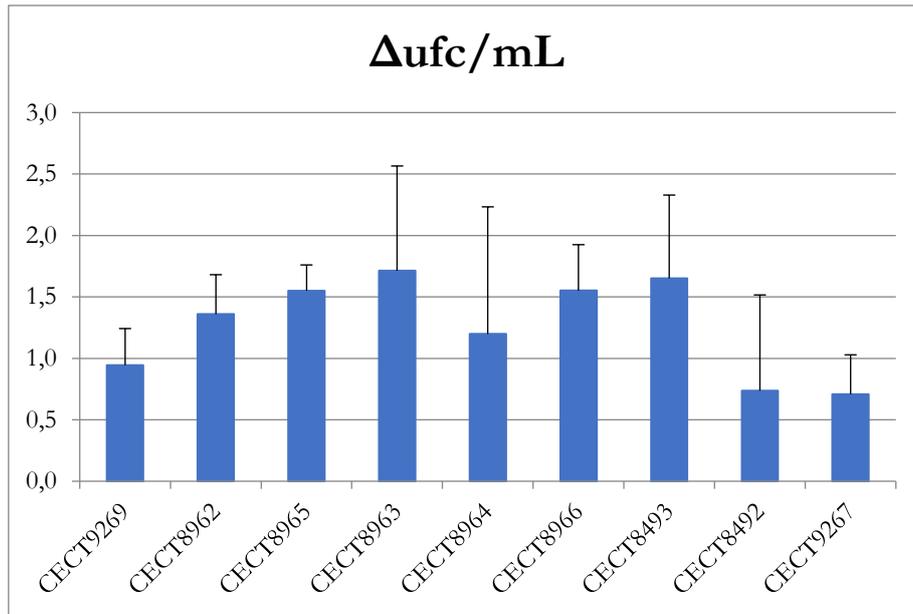


Gráfico 1. Incremento de las ufc/mL entre las cero y las 24 h desde el inicio de la fermentación

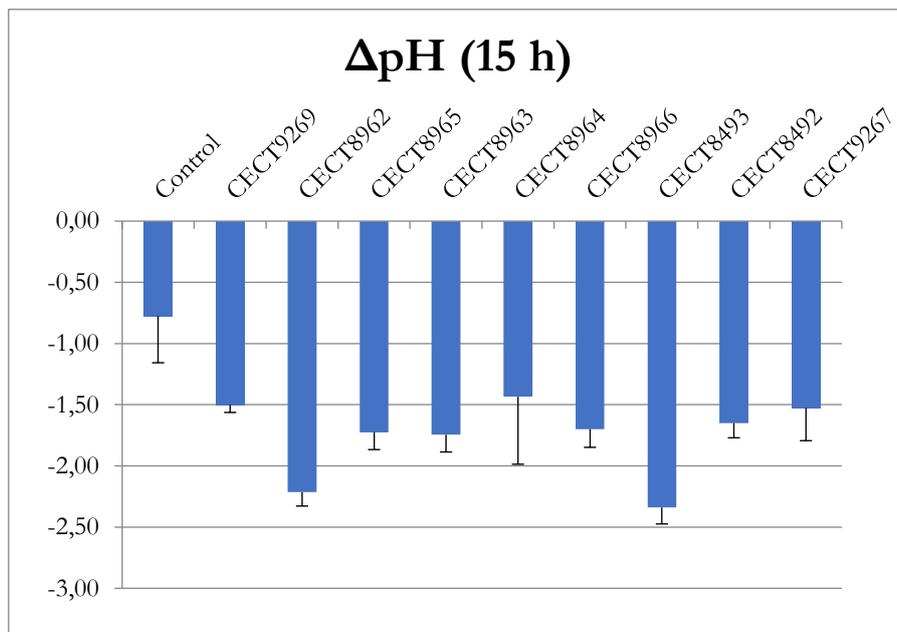


Gráfico 2. Descenso del pH entre las cero y las 15 h desde el comienzo de fermentación.

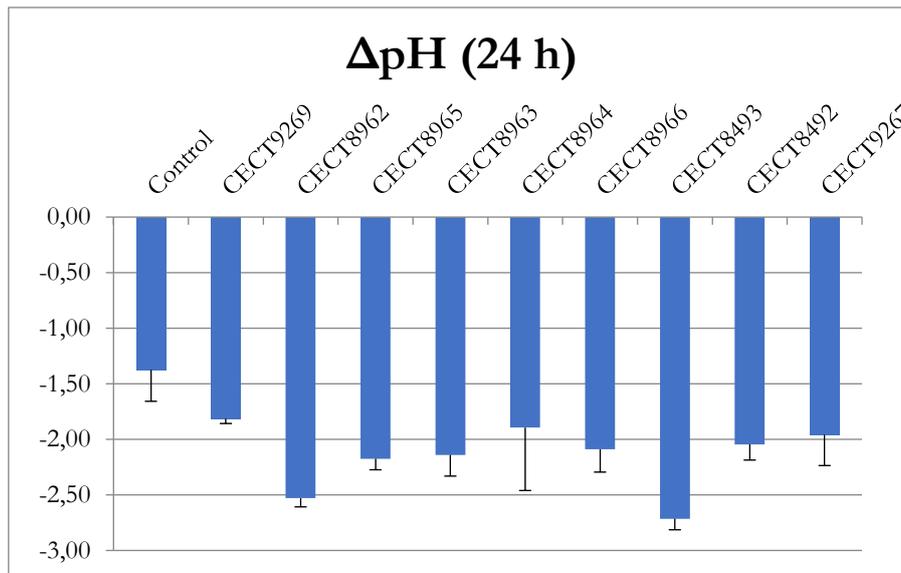


Gráfico 3. Descenso del pH entre las cero y las 24 h desde el comienzo de fermentación.

Como se observa la Gráfica 1, *L. plantarum* CECT 8963 y CECT 8493 son las cepas que presentaron un mayor incremento de ufc/mL. Sin embargo, de acuerdo con un test ANOVA, estas diferencias no son significativas respecto al incremento de las otras cepas no es significativa ya que el p-valor fue mayor que el nivel de significación, fijado en 0,05.

En los Gráfico 2 y Gráfico 3 correspondientes a los descensos del pH, se observa que las cepas que más acidificaron la papilla fueron *L. plantarum* CECT 8962 y CECT 8493, esto sugiere que estas dos cepas poseen un metabolismo más activo.

Mediante el test ANOVA se obtuvo que los valores del descenso de pH, a las 15 y 24 h eran significativamente diferentes unos de otros (p-valor < 0,05). Tras aplicar el post-test de Tukey, se observó que las cepas de *L. plantarum* CECT 8962 y CECT 8493 fueron significativamente diferentes respecto al control y aunque en los Gráfico 2 y Gráfico 3 fuesen las que más descenso del pH provocaron, la diferencia respecto a las demás cepas no fue significativa.

En las placas de los recuentos de 24 h de la papilla sin inocular que conformaba el control negativo, se observaron colonias de morfología diferente a las de los lactobacilos. Tras recoger una muestra, se identificó al contaminante por su morfología mediante microscopía óptica y mediante la secuenciación parcial del ADNr 16S.

La bacteria contaminante se identificó, con una identidad del 100%, como *Bacillus wiedmannii* cepa FSL W8-0169, un bacilo próximo a *Bacillus cereus* y principal contaminante en leches deshidratadas (Miller et al., 2016).

## B. Estudio de la actividad proteolítica

Además del incremento de ufc/mL y de la variación del pH, también se estudiaron las actividades proteolíticas de las diferentes cepas en la papilla nutricional utilizando el reactivo OPA y una SDS-PAGE-Tricina.

Mediante el reactivo OPA se cuantificó la concentración de aminoácidos y péptidos de pequeño tamaño libres en las fases acuosas. Como referencia se utilizó la papilla recién preparada sin inocular ni incubar. Los resultados se muestran en el Gráfico 4.

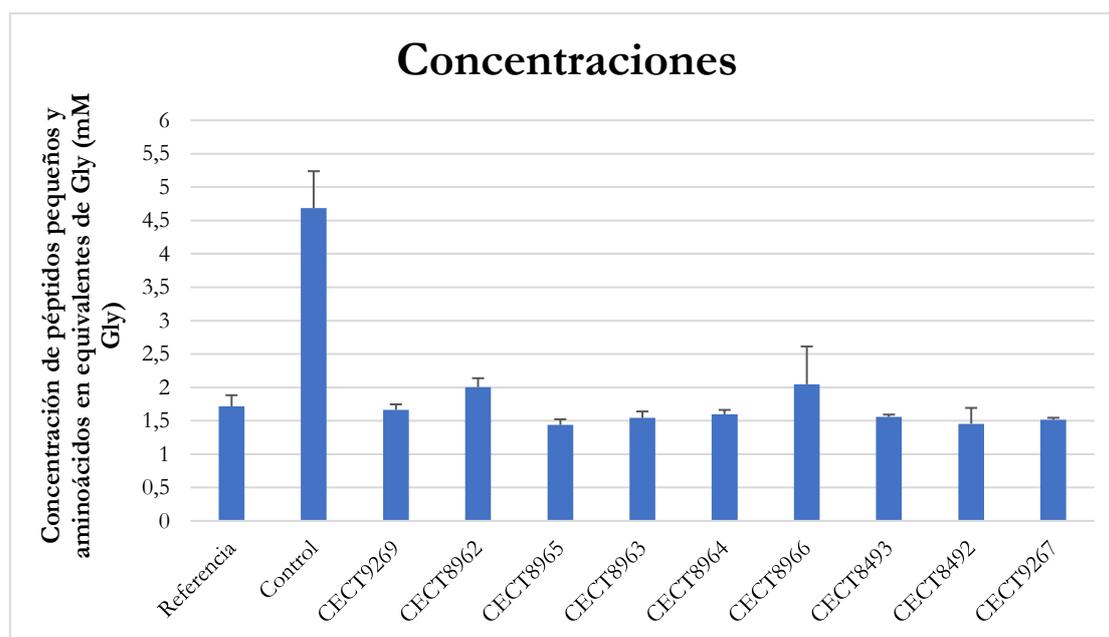


Gráfico 4. Concentraciones de péptidos pequeños y aminoácidos expresadas en equivalentes de glicina del control, la referencia y las cepas

Al comparar los datos obtenidos mediante un test ANOVA, el p-valor fue menor de 0,05, lo que significa que existen diferencias entre los datos. Mediante el post-test de Tukey se puso de manifiesto que el grado de proteólisis del control es significativamente diferente al resto de cepas y de la referencia.

Sin embargo, se puede apreciar que *L. plantarum* CECT 8962 y CECT 8966 poseen una concentración de aminoácidos y péptidos pequeños ligeramente mayor que el resto de las cepas (ver Gráfico 4), lo que significa que ambas cepas poseen el metabolismo más activo en comparación con las demás.

Otra forma de evaluar la actividad proteolítica de las cepas de *Lactobacillus* en la papilla nutricional fue mediante una SDS-PAGE-Tricina, con la que se estudiaron los perfiles proteicos de las fases acuosas de las distintas cepas, en concreto las que estaban presentes en la fracción superior a 3kDa, obtenida mediante centrifugación, ya que en esta fracción se encuentran macromoléculas y péptidos de gran tamaño, producto de la actividad metabólica de las distintas cepas sobre la papilla nutricional.

Tras el teñido y el desteñido posterior a la electroforesis se obtuvo el gel que se muestra en la Figura 3.

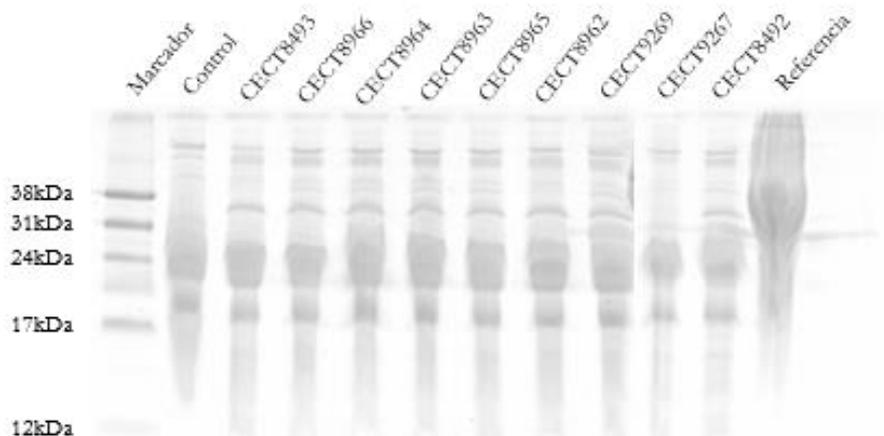


Figura 3. Gel obtenido de una SDS-PAGE-Tricina, fracción mayor de 3kDa de las cepas, el control y la referencia. A la izquierda de se observa la escala de pesos moleculares de acuerdo con el marcador utilizado.

El patrón de bandas entre las cepas fue bastante uniforme, exceptuando a *L. fermentum* CECT 9269 y *L. plantarum* CECT 8492 que presentan una banda adicional entre los 31 y los 24 kDa. También se observó que *L. sakei* CECT 9267 no posee la banda que presentan el resto entre los 38 y los 31 kDa y entorno a los 24 kDa. Esto pone de manifiesto los diferentes mecanismos que posee cada una de las cepas para degradar los componentes de la papilla nutricional.

### C. Cuantificación de ácidos orgánicos mediante HPLC

Para cuantificar los ácidos orgánicos presentes en la fase acuosa tras la fermentación, se utilizó el HPLC.

Se evaluaron las concentraciones de ácido láctico y acético, que son productos de la fermentación de los lactobacilos, por esta razón el valor de referencia se restó al valor del control y al de las nueve cepas. También se evaluó la concentración residual del ácido cítrico presente en la papilla nutricional, el cual puede constituir una fuente de carbono y, por tanto, disminuir tras la fermentación.

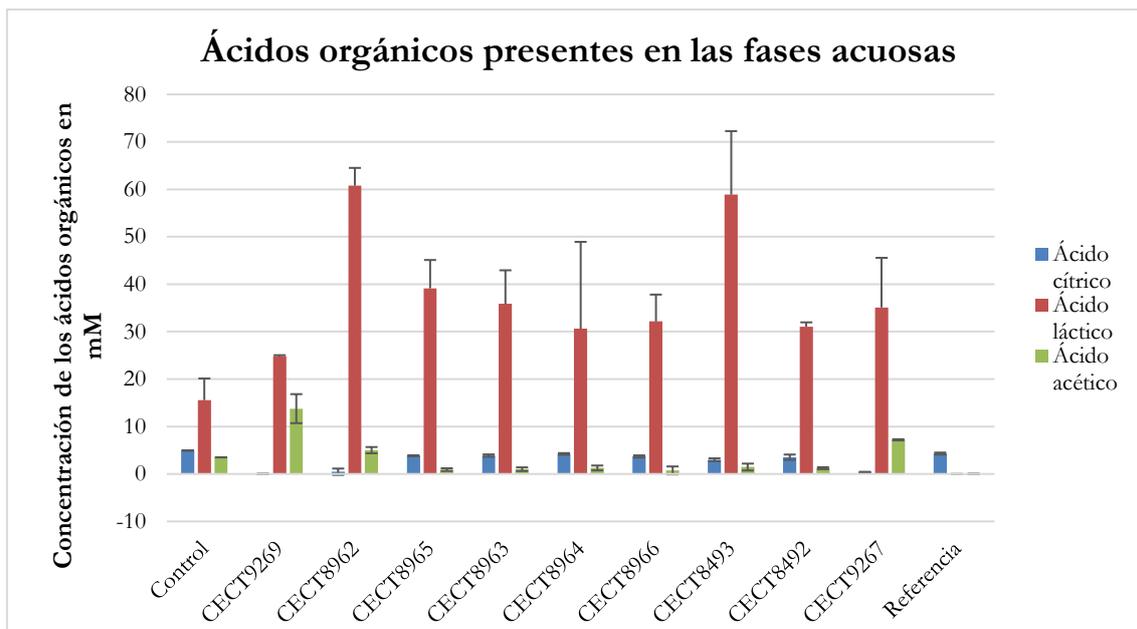


Gráfico 5. Concentraciones de ácidos orgánicos en mM presentes en la fase acuosa de la papilla fermentada por las cepas de lactobacilos, el control y la referencia

Los datos de las concentraciones de ácidos orgánicos, representados en el Gráfico 5, fueron analizados mediante un test ANOVA y el post-test de Tukey, obteniéndose que los datos son significativamente diferentes ya que el p-valor fue menor de 0,05.

Las cepas *L. fermentum* CECT 9269, *L. plantarum* CECT 8962 y *L. sakei* CECT 9267 utilizaron como fuente de carbono el ácido cítrico, disminuyendo su concentración de manera significativa respecto a las demás cepas, control y referencia. Este hecho, pone de manifiesto que el uso de las fuentes de carbono varía de unas especies a otras e incluso entre las cepas de una misma especie. Además, estas cepas son las que más ácido acético producen, siendo la producción de *L. fermentum* CECT 9269 superior significativamente al resto de cepas, control y referencia.

Sin embargo, el ácido orgánico que se produjo en mayor cantidad por parte de todas las cepas fue el ácido láctico. La concentración del ácido de las cepas *L. plantarum* CECT 8962 y CECT 8493, es significativamente superior a la del control y de *L. fermentum* CECT 9269, lo que se correlaciona con la bajada de pH y con que estas cepas en concreto sean las que presenten un metabolismo más activo.

#### D. Análisis de la actividad antagonista

Para comprobar la posible actividad antagonista de las cepas, una vez crecidas en la papilla se realizaron dos pruebas, la primera un test de difusión en agar, para comprobar si existe actividad antifúngica y/o antimicrobiana, y la segunda un ensayo de actividad antifúngica *in situ*.

### I. Test de difusión en agar

Después de inocular los medios con las cepas indicadoras y de dejar en cada pocillo las fases acuosas neutralizadas y no neutralizadas, las placas se incubaron a las temperaturas correspondientes, hasta que las cepas alcanzaron su crecimiento óptimo y se observó claramente un césped.

En ninguno de los test de difusión en agar se observaron halos de inhibición del crecimiento. Esto no significa que las fases acuosas carezcan de actividad antagonista, sino que es posible que la concentración del agente inhibitorio no sea suficiente. De hecho, en el artículo de Yépez et al (2017) se expone que además de neutralizar los sobrenadantes libres de células, también se deben concentrar (Yépez et al., 2017).

### II. Actividades antifúngicas *in situ*

En un primer lugar se evaluó el crecimiento de cada hongo en la papilla para determinar el nivel de contaminación a utilizar en los ensayos posteriores. Para ello cada pocillo de una placa de microtítulo se inoculó en superficie con aproximadamente 1000, 500, 100, 50, 10 y tres esporas. Se dejaron incubando a 25°C y durante tres días se fue observando el crecimiento de los hongos. Se concluyó con que el nivel de contaminación óptimo serían 50 esporas por pocillo, ya que, con ese nivel de contaminación se observó visualmente el crecimiento de los hongos en tres días.

Para evaluar la actividad antifúngica *in situ* se plantearon dos tipos de ensayos: co-cultivo bacteria-hongo y ensayo de post-contaminación. En ambos ensayos, los lactobacilos se incubaron en placas de microtítulo siguiendo el esquema de la Figura 4.

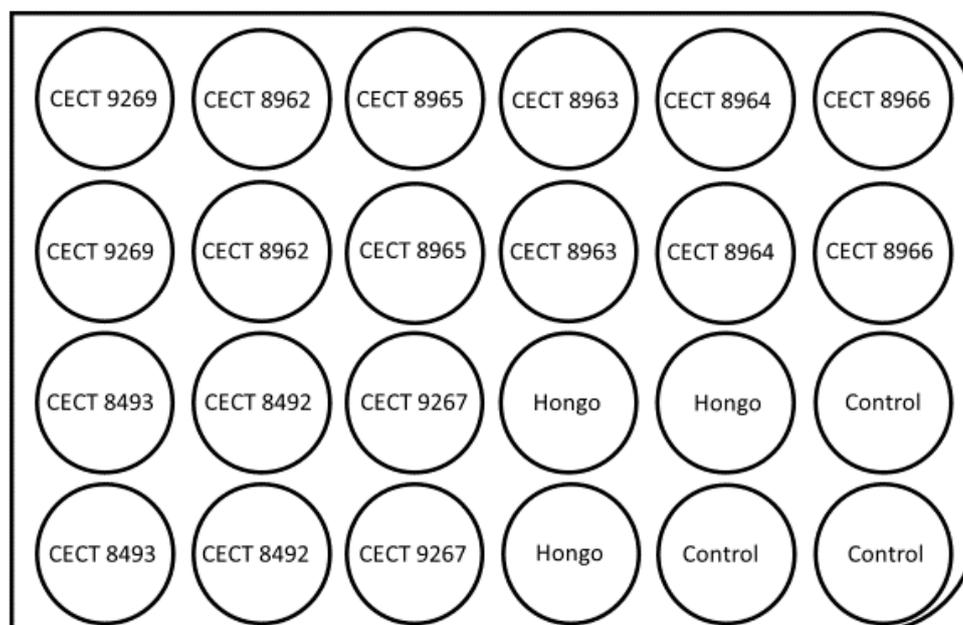


Figura 4. Esquema con la disposición de las cepas de Lactobacillus, control positivo ("Hongo") que consiste en la papilla inoculada con una cepa fúngica, y un control negativo ("Control") compuesto de papilla nutricional sin inocular. En el caso de la placa que solo fue inoculada con los Lactobacillus los pocillos de "Hongo" no fueron inoculados con ninguna cepa fúngica.

### 1. Ensayos de inhibición directa in situ. Co-cultivos

Tras repartir la papilla nutricional e inocularla con los lactobacilos y los hongos, las placas de microtítulo se dejaron incubar a 25°C durante 9 días.

Se realizaron fotografías a las 0, 24, 72, 117 y 216 h (ver Figura 5). Durante las primeras 24 h no se apreció ningún cambio ni de color ni de textura. Sin embargo, esta situación cambia a partir de las 72 h (tres días), cuando se apreció algún cambio de color y en el caso de *G. moniliformis* CECT 2987 se ven parches en casi todos los pocillos en los que el hongo comenzó a esporular, dado su aspecto y coloración.

Al cabo de 216 h (nueve días), se observó que *A. oryzae* var. *oryzae* CECT 2094 se desarrolló muy lentamente en los pocillos inoculados con los lactobacilos. Solo se observó un crecimiento mayor en los pocillos correspondientes a *L. plantarum* CECT 8964, a *L. sakei* CECT 9267, hongo y control.

*P. expansum* CECT 2278 y *A. parasiticus* CECT 2681 se desarrollaron más, llegando a esporular en algunos pocillos. Al observar la Figura 5, se puede observar que los pocillos correspondientes a *L. plantarum* CECT 8962 fueron en los que es su conjunto hubo un menor desarrollo de ambos hongos.

Co-cultivo	0 h	24 h	72 h	117 h	216 h
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i>					
<i>Penicillium expansum</i>					
<i>Aspergillus parasiticus</i>					
<i>Gibberella moniliformis</i>					ND

Figura 5. Co-cultivos de las distintas cepas de lactobacilos con las distintas cepas de hongos en la papilla nutricional, incubados durante nueve días a 25°C. ND son las siglas de “No Determinado”)

## 2. Ensayos de inhibición in situ. Post-contaminación

Las placas de post-contaminación y el control ambiental fueron incubadas durante las primeras 24 h a 32°C, una vez inoculadas con lactobacilos. Después las placas para la post-contaminación fueron inoculadas con los distintos hongos, 50 esporas por pocillo y fueron almacenadas a 6°C durante 27 días.

En este caso, las placas fueron fotografiadas a las 0, 24, 72, 117 y 216 h, y a los 15 y 27 días desde que se inoculó la papilla nutricional con los lactobacilos.

Se vieron cambios de coloración desde las 24 h en adelante, pero solo en el caso de *P. expansum* CECT 2278, se observó un mayor desarrollo del hongo a partir de los 15 días, que en algunos pocillos comenzó a esporular.

Transcurrido un mes desde que se inocularon las placas de post-contaminación con los lactobacilos, se tomaron alícuotas de los pocillos y se realizaron recuentos microbiológicos en YGC, un medio selectivo para hongos y levaduras, con el objetivo de cuantificar las ufc/mL fúngicas y evaluar así el crecimiento de los hongos.

Después de 72 h a 25°C de incubación de las placas de recuentos, no se observó ninguna colonia de *A. oryzae* var. *oryzae* CECT 2094, ni de *A. parasiticus* CECT 2681. Esto no significa que no estén presentes en la papilla, que había sido inoculada con 50 esporas, sino que se encuentran por debajo del límite de detección de 100 ufc/mL, lo que significa que estos dos hongos no consiguen multiplicarse en este sustrato a esta temperatura.

Sin embargo, sí se observaron colonias de *P. expansum* CECT 2278 (ver Gráfico 6) y de *G. moniliformis* CECT 2987 (ver Gráfico 7).

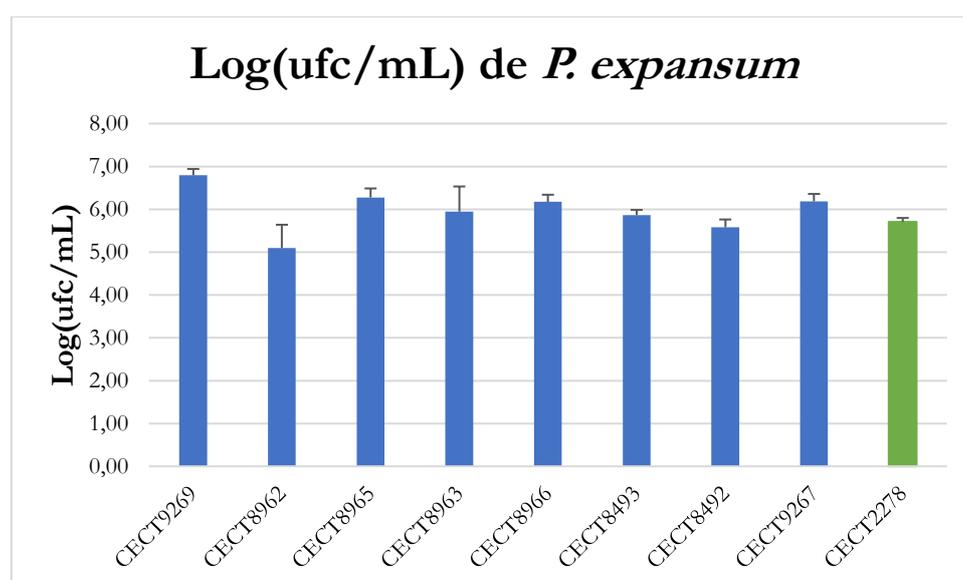


Gráfico 6. ufc/mL de *Penicillium expansum* representadas en logaritmo en base diez, tras un mes creciendo a 6°C en papillas fermentadas por distintas cepas de *Lactobacillus* (en color azul) y en solitario (en color verde)

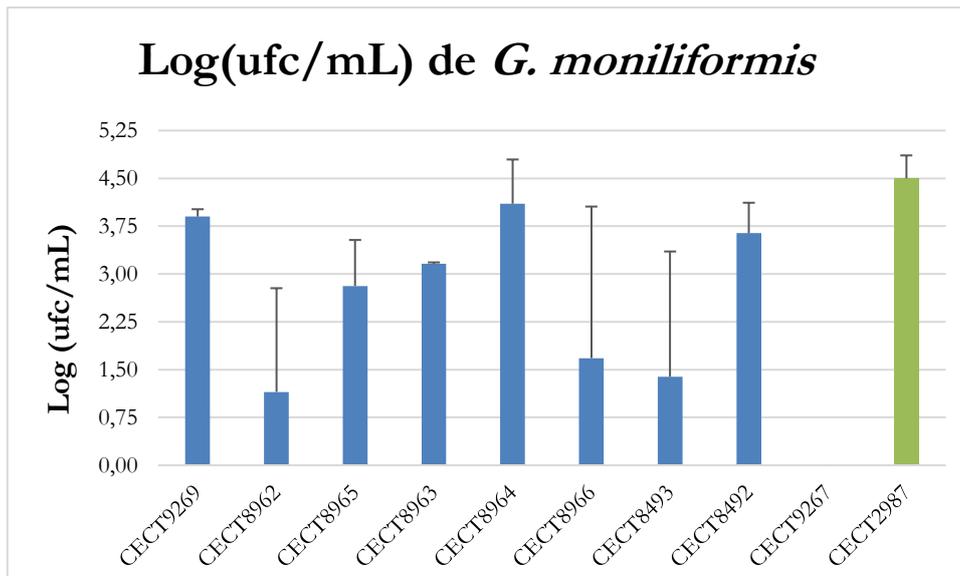


Gráfico 7. *ufc/mL* de *Gibberella moniliformis* representadas en logaritmo en base diez, tras un mes creciendo a 6°C en papillas fermentadas por distintas cepas de *Lactobacillus* (en color azul) y en solitario (en color verde)

Tras analizar los datos estadísticamente mediante un test ANOVA y el post-test de Tukey, no se obtuvieron diferencias significativas entre el crecimiento de *P. expansum* CECT 2278 con o sin *Lactobacillus*, excepto cuando crece en presencia de *L. fermentum* CECT 9269. En este caso se observó que su crecimiento fue significativamente superior que cuando crece en solitario. Lo que puede significar que esta cepa de lactobacilo tenga un efecto positivo en el crecimiento del hongo.

Sin embargo, sí se aprecian diferencias, aunque no significativas entre el desarrollo del hongo con las distintas cepas de lactobacilos y su desarrollo en solitario. En el Gráfico 6, se puede observar que su crecimiento es menor con *L. plantarum* CECT 8962, siendo también menor a cuando creció en solitario.

En el caso de *G. moniliformis* CECT 2987 no existían diferencias significativas entre su crecimiento en la papilla fermentada con las cepas de *Lactobacillus* o en solitario. Al observar el Gráfico 7, se aprecia que el desarrollo de *G. moniliformis* CECT 2987 es menor cuando crece en presencia de *L. plantarum* CECT 8962.

Se ha de destacar que en el caso la papilla fermentada previamente con *L. sakei* CECT 9267, no se obtuvo ninguna colonia, pese a que la papilla había sido inoculada con 50 esporas. Esto significa que esta cepa de lactobacilo es capaz de inhibir el crecimiento posterior de *G. moniliformis* CECT 2987.

Post-contaminación	0 h	24 h	72 h	117 h	216 h	15 d	27 d
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>oryzae</i>							
<i>Penicillium expansum</i>							
<i>Aspergillus parasiticus</i>							
<i>Gibberella moniliformis</i>							
Control ambiental							

Figura 6. Post-contaminación con hongos en la papilla nutricional fermentada con cepas de lactobacilos durante 24h a 32°C, y control ambiental a lo largo de su almacenamiento a 6°C.

Durante el desarrollo de este estudio, se observaron unos cambios de color muy característicos en algunos de los pocillos. Debido a que se dieron en los co-cultivos, en los ensayos de post-contaminación e incluso en la placa inoculada solo con las cepas de *Lactobacillus*. Se pensó que no estaban relacionados con las cepas fúngicas utilizadas, sino con otro agente contaminante ajeno. Por ello a partir de la placa de lactobacilos sin inocular se realizaron recuentos microbiológicos en un medio selectivo para hongos y mohos, YGC.

En ninguna de las placas se observó ninguna colonia, lo que puede significar que el límite de detección no es el adecuado, ya que la alícuota extraída pudo haber sido diluida en exceso. O bien que el agente contaminante no sea ni un hongo ni un moho, sino una bacteria, muy probablemente *Bacillus wiedmannii* cepa FSL W8-0169.

## 4. Conclusión

Al igual que en artículo de Yépez et al (2017), algunas cepas de *Lactobacillus* han demostrado ser capaces de inhibir el crecimiento de las cepas fúngicas más comunes en la industria alimenticia. Si bien es cierto que los sobrenadantes obtenidos durante la fermentación de 24 h en la papilla nutricional no lograron inhibir el crecimiento de las cepas indicadoras, debido a que no estaban concentradas como si lo estaban los sobrenadantes de Yépez et al (2017), se vieron efectos muy similares en los ensayos de inhibición directa *in situ* mediante los co-cultivos y también en el de post-contaminación.

Se observó que *L. sakei* CECT 9267 fue capaz de inhibir el crecimiento de *G. moniliformis* CECT 2987, cuando este creció en la papilla fermentada por esa cepa. Sin embargo, es *L. plantarum* CECT 8962, quien ha mostrado más aptitudes para ser utilizada como antifúngico, ya que, aunque no fue una de las cepas con un mayor crecimiento en la papilla nutricional, fue una de las mayores productoras de ácidos orgánicos y, por lo tanto, la que causa un mayor descenso de pH a largo plazo. Esta bajada de pH, sumada a la producción de 11 tipos de sustancias fenólicas, estudiadas por Yépez et al, tienen como consecuencia la inhibición o ralentización del crecimiento de los distintos hongos, lo que convierte a *L. plantarum* CECT 8962 en una buena candidata para ser utilizada como conservante en la industria alimenticia.

## 5. Referencias

- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Antifungal sourdough lactic acid bacteria as biopreservation tool in quinoa and rice bread. *International Journal of Food Microbiology*, *239*, 86–94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.006>
- Axel, C., Brosnan, B., Zannini, E., Peyer, L. C., Furey, A., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2016). Antifungal activities of three different *Lactobacillus* species and their production of antifungal carboxylic acids in wheat sourdough. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*, 1701–1711. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7051-x>
- Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H., & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric Assay Using o-Phthaldialdehyde for Determination of Proteolysis in Milk and Isolated Milk Proteins. *Journal of Dairy Science*, *66*, 1219–1227. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81926-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81926-2)
- Crowley, S., Mahony, J., & Van Sinderen, D. (2013). Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends in Food Science and Technology*, *33*, 93–109. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2013.07.004>
- Dallagnol, A. M., Pescuma, M., De Valdez, G. F., & Rollán, G. (2013). Fermentation of quinoa and wheat slurries by *Lactobacillus plantarum* CRL 778: Proteolytic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 3129–3140. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4520-3>
- Gajbhiye, M. H., & Kapadnis, B. P. (2016). Antifungal-activity-producing lactic acid bacteria as biocontrol agents in plants. *Biocontrol Science and Technology*, *26*, 1451–1470. <https://doi.org/10.1080/09583157.2016.1213793>
- García-Segura, J. M. (1999). Cromatografía. In *Técnicas instrumentales de análisis en bioquímica*, 1ª ed., 291–382. Madrid: Síntesis.
- GraphPad Software. (n.d.). One-way ANOVA with Tukey's post test was performed using GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA. Retrieved from [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)
- Jones, B. N., Pääbo, S., & Stein, S. (1981). Amino Acid Analysis and Enzymatic Sequence Determination of Peptides by an Improved o -Phthaldialdehyde Precolumn Labeling Procedure. *Journal of Liquid Chromatography*, *4*, 565–586. <https://doi.org/10.1080/01483918108059956>
- Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J., & Karpíšková, R. (2017). Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *33*: 188. <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2354-y>

- Miller, R. a., Beno, S. M., Kent, D. J., Carroll, L. M., Martin, N. H., Boor, K. J., & Kovac, J. (2016). *Bacillus wiedmannii* sp. nov., a psychrotolerant and cytotoxic bacillus cereus group species isolated from dairy foods and dairy environments. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *66*, 4744–4753. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001421>
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2013). Amino acids, peptides and proteins. In *Lehninger Principles of Biochemistry*, 6th ed., 75–156. New York: W. H. Freeman and Company.
- Pawlowska, A. M., Zannini, E., Coffey, A., & Arendt, E. K. (2012). “Green Preservatives”: Combating Fungi in the Food and Feed Industry by Applying Antifungal Lactic Acid Bacteria. En *Advances in Food and Nutrition Research*, 1st ed., *66*, 217–238. USA: Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394597-6.00005-7>
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2017). Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *8398*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1295017>
- Russo, P., Arena, M. P., Fiocco, D., Capozzi, V., Drider, D., & Spano, G. (2017). Lactobacillus plantarum with broad antifungal activity: A promising approach to increase safety and shelf-life of cereal-based products. *International Journal of Food Microbiology*, *247*, 48–54. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.027>
- Schägger, H. (2006). Tricine–SDS–PAGE. *Nature Protocols*, *1*, 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, *166*, 368–379. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Simons, S. S., & Johnson, D. F. (1977). Preparation of a stable, fluorescent 1-alkylthio-2-alkylisoindole. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, *0*, 374. <https://doi.org/10.1039/c39770000374>
- Turpin, W., Weiman, M., Guyot, J. P., Lajus, A., Cruveiller, S., & Humblot, C. (2018). The genomic and transcriptomic basis of the potential of Lactobacillus plantarum A6 to improve the nutritional quality of a cereal based fermented food. *International Journal of Food Microbiology*, *266*, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.011>
- Yépez, A., Luz, C., Meca, G., Vignolo, G., Mañes, J., & Aznar, R. (2017). Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. *Food Control*, *78*, 393–400. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.03.009>
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L., & Miller, W. (2000). A Greedy Algorithm for Aligning DNA

Sequences. *Journal of Computational Biology*, 7, 203–214.  
<https://doi.org/10.1089/10665270050081478>

Zhao, H., Vegi, A., & Wolf-Hall, C. (2017). Screening of Lactic Acid Bacteria for Anti- *Fusarium* Activity and Optimization of Incubation Conditions. *Journal of Food Protection*, 80, 1648–1656.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-100>