

Djamel Drider • Victor M. Rivera

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Fundamentos y Aplicaciones



 **Alfaomega**

Bacterias ácido lácticas

Fundamentos y aplicaciones

Djamel Drider

Victor Manuel Rivera Arredondo



Director Editorial
Marcelo Grillo Giannetto
mgrillo@alfaomega.com.mx

Jefe de Ediciones
Francisco Javier Rodríguez Cruz
jrodriguez@alfaomega.com.mx

Datos catalográficos

Drider, Djamel y Rivera, Victor Manuel
Bacterias ácido lácticas. Fundamentos y aplicaciones

Primera Edición

Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. México

ISBN 978-607-622-628-5

Formato: 17 × 23 cm

Páginas: 352

Bacterias ácido lácticas. Fundamentos y aplicaciones

Djamel Drider y Victor Manuel Rivera Arredondo

Derechos reservados © Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V., México

Primera edición: Alfaomega Grupo Editor, México, febrero de 2016

© 2016 Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. México

Pitágoras 1139, Col. Del Valle, C.P. 03100, México, D.F.

Miembro de la Cámara Nacional de la Industria Editorial Mexicana
Registro No. 2317

Pág. Web: <http://www.alfaomega.com.mx>
E-mail: atencionalcliente@alfaomega.com.mx

ISBN: 978-607-622-628-5

Derechos reservados:

Esta obra es propiedad intelectual de su autor y los derechos de publicación en lengua española han sido legalmente transferidos al editor. Prohibida su reproducción parcial o total por cualquier medio sin permiso por escrito del propietario de los derechos del copyright.

Nota importante:

La información contenida en esta obra tiene un fin exclusivamente didáctico y, por lo tanto, no está previsto su aprovechamiento profesional o industrial. Las indicaciones técnicas y programas incluidos han sido elaborados con gran cuidado por el autor y reproducidos bajo estrictas normas de control. ALFAOMEGA GRUPO EDITOR, S.A. de C.V. no será jurídicamente responsable por: errores u omisiones; daños y perjuicios que se pudieran atribuir al uso de la información comprendida en este libro, ni por la utilización indebida que pudiera dársele. Los nombres comerciales que aparecen en este libro son marcas registradas de sus propietarios y se mencionan únicamente con fines didácticos, por lo que ALFAOMEGA GRUPO EDITOR, S.A. de C.V. no asume ninguna responsabilidad por el uso que se dé a esta información, ya que no infringe ningún derecho de registro de marca. Los datos de los ejemplos y pantallas son ficticios, a no ser que se especifique lo contrario.

Edición autorizada para venta en todo el mundo.

Impreso en México. Printed in Mexico.

Empresas del grupo:

México: Alfaomega Grupo Editor, S.A. de C.V. – Pitágoras 1139, Col. Del Valle, México, D.F. – C.P. 03100.

Tel.: (52-55) 5575-5022 – Fax: (52-55) 5575-2420 / 2490. Sin costo: 01-800-020-4396

E-mail: atencionalcliente@alfaomega.com.mx

Colombia: Alfaomega Colombiana S.A. – Calle 62 No. 20-46, Barrio San Luis, Bogotá, Colombia,

Tels.: (57-1) 746 0102 / 210 0415 – E-mail: cliente@alfaomega.com.co

Chile: Alfaomega Grupo Editor, S.A. – Av. Providencia 1443. Oficina 24, Santiago, Chile

Tel.: (56-2) 2235-4248 – Fax: (56-2) 2235-5786 – E-mail: agechile@alfaomega.cl

Argentina: Alfaomega Grupo Editor Argentino, S.A. – Paraguay 1307 P.B. Of. 11, C.P. 1057, Buenos Aires, Argentina,

Tel./Fax: (54-11) 4811-0887 y 4811 7183 – E-mail: ventas@alfaomegueditor.com.ar

Acerca de los autores

Prof. Djamel Drider. El Dr. Drider es profesor de Microbiología en la Universidad de Lille (Francia): Ciencias y Tecnologías. Completo su carrera profesional en Microbiología en la Universidad de Tizi-Ouzou, Argelia; realizó su Maestría y Doctorado en Montpellier (Francia) antes de viajar a Madrid y Nueva York para completar una formación Postdoctoral en el Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC y en la Mount Sinai Escuela de Medicina (NY-NYU). El Prof. Djamel realiza sus investigaciones dentro el Instituto Charles Viollette y sus actividades de docencias en el Instituto Universitario de Tecnología, ha liderado la coordinación de varios libros y realizado varias publicaciones en diversas revistas internacionales. Es responsable de un equipo de investigadores de 35 miembros que se dedica a la calidad y seguridad de los alimentos; es también responsable del servicio de microbiología dentro el Instituto Universitario de Tecnología y del Diplomado Universitario en Calidad de los Alimentos. Actualmente es editor de varias revistas científicas y presidente de la Sociedad Francesa de Péptidos Antimicrobianos.

Dr. Victor Manuel Rivera Arredondo. El Dr. Victor M. Rivera es profesor-investigador y coordinador del Programa Educativo de Ingeniería en Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana Región Xalapa (FCQ UV-X). Se formó profesionalmente como Ingeniero Químico por parte el Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec y, como Maestro y Doctor en Ciencias (Ingeniería Química) por la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa. Es colaborador del cuerpo académico de “Implementación y Mejora de Sistema de Gestión de Calidad y Producción Agroalimentaria” de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz y de los cuerpos académicos de “Ingeniería de los Procesos Químicos y Biológicos” y “Matemáticas Aplicadas para Análisis de Procesos” de la FCQ UV-X. Ha realizado presentaciones de sus investigaciones en varios congresos nacionales e internacionales, dirigido varias tesis de licenciatura y posgrado, así como realizado diversas publicaciones en revistas internacionales. Actualmente es miembro del padrón de evaluadores del Consejo de Acreditación de la Enseñanza de la Ingeniería (CACEI) y del comité de validación de reactivos del CENEVAL para los exámenes EGEL-IQ y EGEL-IA.

Agradecimiento

A nombre del Programa Educativo de Procesos Alimentarios de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, quiero agradecer a todos los investigadores y sus respectivos grupos de trabajo por la participación en este proyecto sobre bacterias ácido-lácticas.

En el desarrollo de este estudio se ha realizado un gran esfuerzo de colaboración con investigadores y especialistas de gran reconocimiento internacional en los temas que se tratan a lo largo de esta recopilación.

Una de las metas de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz es interrelacionarse de manera internacional para poder posicionar a nuestra Casa de Estudios en el ámbito mundial de la educación e investigación. La labor llevada a cabo dentro de este proyecto es un gran paso de varios que, de manera lateral y continua, se han dado en la búsqueda de dicho fin.

Reitero mi agradecimiento a cada uno de los investigadores que cooperaron para la elaboración de esta obra; gracias por su esfuerzo, dedicación y profesionalismo, que, sin duda, dejará huella en la formación de los estudiantes.

Sinceramente.

Ing. Guillermo Lozano Sánchez

Rector de la Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz

Mensaje del editor

Una de las convicciones fundamentales de Alfaomega es que los conocimientos son esenciales en el desempeño profesional, ya que sin ellos es imposible adquirir las habilidades para competir laboralmente. El avance de la ciencia y de la técnica hace necesario actualizar continuamente esos conocimientos, y de acuerdo con esto Alfaomega publica obras actualizadas, con alto rigor científico y técnico, y escritas por los especialistas del área respectiva más destacados.

Consciente del alto nivel competitivo que debe de adquirir el estudiante durante su formación profesional, Alfaomega aporta un fondo editorial que se destaca por sus lineamientos pedagógicos que coadyuvan a desarrollar las competencias requeridas en cada profesión específica.

De acuerdo con esta misión, con el fin de facilitar la comprensión y apropiación del contenido de esta obra, cada capítulo inicia con el planteamiento de los objetivos del mismo y con una introducción en la que se plantean los antecedentes y una descripción de la estructura lógica de los temas expuestos, asimismo a lo largo de la exposición se presentan ejemplos desarrollados con todo detalle y cada capítulo concluye con un resumen.

Además de la estructura pedagógica con que están diseñados nuestros libros, Alfaomega hace uso de los medios impresos tradicionales en combinación con las Tecnologías de la Información y las Comunicaciones (TIC) para facilitar el aprendizaje. Correspondiente a este concepto de edición, todas nuestras obras tienen su complemento en una página Web en donde el alumno y el profesor encontrarán lecturas complementarias así como programas desarrollados en relación con temas específicos de la obra.

Los libros de Alfaomega están diseñados para ser utilizados en los procesos de enseñanza aprendizaje, y pueden ser usados como textos en diversos cursos o como apoyo para reforzar el desarrollo profesional, de esta forma Alfaomega espera contribuir a la formación y al desarrollo de profesionales exitosos para beneficio de la sociedad, y espera ser su compañera profesional en este viaje de por vida por el mundo del conocimiento.

Contenido

Introducción	1
Capítulo 1	
Funciones generales de las bacterias ácido lácticas	3
1.1 Introducción.....	3
1.2 Las BAL como microorganismos alterantes	4
1.3 Las BAL como microorganismos beneficiosos.....	5
1.4 Fermentación de alimentos.....	6
1.5 Definición de alimentos fermentados.....	6
1.6 Fermentación de la leche	7
1.7 Fermentación de la carne	9
1.8 Fermentación de vegetales	10
1.9 Fermentación de bebidas	10
1.10 Biopreservación de alimentos	11
1.10.1 Metabolitos producidos por las BAL	12
1.11 Bacterias lácticas probióticas.....	15
1.11.1 Efectos/beneficios de los probióticos.....	17
1.11.2 Seguridad de los probióticos	17
Capítulo 2	
Aislamiento e identificación de las bacterias ácido lácticas.....	25
2.1 Introducción.....	25
2.2 Aislamiento de las bacterias del ácido láctico.....	26
2.3 Identificación basada en pruebas fenotípicas	27
2.4 Identificación basada en análisis del ADN	28
2.4.1 Hibridación ADN-ADN	28
2.4.2 Métodos basados en la PCR	29
2.4.3 Métodos basados en digestiones enzimáticas	32
2.5 Métodos independientes de cultivo.....	32
2.5.1 Huellas genéticas (fingerprinting).....	33
2.5.2 Métodos <i>in situ</i>	34
2.5.3 Secuenciación	35
2.5.4 Microarrays.....	37
2.5.5 Citometría de flujo.....	37
2.6 Conclusiones.....	37
Capítulo 3	
Grupo de bacterias ácido lácticas	41
3.1 Introducción.....	41

Capítulo 3A

<i>Leuconostoc</i>	46
3A.1 Introducción.....	46
3A.2 Hábitat	47
3A.3 Taxonomía e identificación	48
3A.4 Genética	49
3A.5 Salud y rol en alimentos funcionales.....	49
3A.6 Conclusiones.....	50

Capítulo 3B

<i>Lactococcus</i>	56
3B.1 Introducción.....	56
3B.2 Taxonomía y evolución al ambiente lácteo.....	56
3B.3 <i>Lactococcus lactis</i> en cultivos iniciadores	58
3B.4 Contribución de <i>L.Lactis</i> a la fermentación de la leche y a la formación de aroma y sabor en el queso.....	59
3B.5 Actividad glicolítica.....	59
3B.6 Actividad proteolítica.....	60
3B.6.1 Proteinasa de pared celular	61
3B.6.2 Sistemas de transporte de péptidos y aminoácidos.....	61
3B.6.3 Peptidasas de <i>L. Lactis</i>	61
3B.7 Catabolismo de aminoácidos: rutas y actividades enzimáticas.....	62
3B.7.1 Actividad aminotransferasa.....	62
3B.7.2 Actividad hidroxilácido deshidrogenasa	63
3B.7.3 Actividad cetoácido deshidrogenasa.....	64
3B.7.4 Actividad cetoácido descarboxilasa	64
3B.7.5 Actividad liasa.....	64
3B.8 Regulación de la expresión génica en <i>L. Lactis</i> y diversidad genética.....	65
3B.9 Conclusiones.....	66

Capítulo 3C

<i>Enterococcus</i>	69
3C.1 Introducción.....	69
3C.2 Epidemiología molecular de los enterococos.....	71
3C.3 Factores de adaptación al hospedador y virulencia.....	72
3C.4 Producción de aminas biógenas	77
3C.5 Resistencia a antibióticos.....	79
3C.6 Producción de bacteriocinas.....	81
3C.7 Potencial biotecnológico de los enterococos	82
3C.8 Conclusiones.....	86

Capítulo 3D

<i>Pediococcus</i>	99
3D.1 Introducción.....	99
3D.2 Fisiología	100
3D.3 Hábitat	101
3D.4 Aplicaciones biotecnológicas	102
3D.4.1 Fermentación de productos cárnicos.....	102
3D.4.2 Fermentación de productos vegetales	102
3D.4.3 Fermentación de productos lácteos.....	103
3D.4.4 Fermentación de alimentos marinos	103
3D.4.5 Fermentación de ensilados	104
3D.4.6 Producción de bacteriocinas y bioconservación de alimentos.....	104
3D.4.7 Probióticos	105
3D.5 Alteraciones de alimentos y bebidas	105

Capítulo 3E

<i>Carnobacterium</i>	110
3E.1 Introducción.....	110
3E.2 Distribución en el medio ambiente y alimentos.....	111
3E.2.1 Medio ambiente.....	111
3E.2.2 Productos lácteos, cárnicos y pesqueros	114
3E.3 Propiedades funcionales de carnobacterias.....	117
3E.3.1 Bacteriocinas y propiedades antimicrobianas	117
3E.3.2 Efecto de actividades catabólicas en las características organolépticas y seguridad de los alimentos.....	123
3E.4 Carnobacterias como organismos patógenos y/o cultivos probióticos.....	128
3E.5 Genómica.....	132
3E.6 Conclusiones.....	132

Capítulo 3F

<i>Lactobacillus</i>	168
3F.1 Introducción.....	168
3F.2 Clasificación e identificación.....	169
3F.3 Metabolismo fermentativo.....	169
3F.4 Hábitat	170
3F.5 Papel en la elaboración de alimentos fermentados.....	171
3F.6 Producción de ensilados para pienso	173
3F.7 Alteración de alimentos y bebidas.....	173
3F.8 Producción de bacteriocinas.....	174
3F.9 Efectos beneficiosos para la salud	175
3F.10 Patogenicidad.....	176

Capítulo 3G

<i>Oenococcus</i>	178
3G.1 Introducción.....	178
3G.2 <i>Oenococcus Oeni</i>	179
3G.3 Diversidad Intra-Específica de la especie <i>O. Oeni</i>	180
3G.3.1 Identificación y tipificación molecular.....	180
3G.3.2 Mecanismos de adaptación al estrés ambiental.....	182
3G.4 Usos industriales.....	183
3G.4.1 Elaboración del vino.....	183
3G.4.2 Producción de compuestos aromáticos.....	184
3G.4.3 Producción de exopolisacáridos	185
3G.5 Alteración del vino.....	186
3G.6 Conclusiones.....	187

Capítulo 3H

<i>Streptococcus</i>	191
3H.1 Introducción.....	191
3H.2 <i>Streptococcus thermophilus</i>	192
3H.3 Propiedades tecnológicas de <i>Streptococcus thermophilus</i>	193
3H.3.1 Metabolismo de los azúcares.....	193
3H.3.2 Sistema proteólico y metabolismo aminoacídico	194
3H.3.3 Metabolismo de la urea.....	195
3H.3.4 Resistencia a fagos.....	196
3H.3.5 Biosíntesis de exopolisacáridos	197
3H.4 Propiedades Probióticas de <i>Streptococcus thermophilus</i>	198
3H.4.1 Producción de bacteriocinas	198
3H.4.2 Biosíntesis de folato.....	199
3H.4.3 Producción de biosurfactante	199
3H.5 Otras especies de interés alimentario o biomédico.....	199
3H.6 Conclusiones.....	200

Capítulo 4

Genética y fagos de las bacterias ácido lácticas	203
4.1 Introducción.....	203

Capítulo 4A

Expresión y manipulación genética de las bacterias lácticas	206
4A.1 Introducción.....	206
4A.2 Sistemas de expresión genética de <i>Lactococcus lactis</i>	207
4A.3 Manipulación cromosómica	214
4A.4 Perspectivas futuras	217

Capítulo 4B

Fagos de bacterias lácticas	221
4B.1 Introducción.....	221
4B.2 Clasificación y ciclo biológico.....	221
4B.3 Mecanismos de resistencia a fagos	224
4B.4 Estrategias anti-fago.....	225
4B.4.1 Estrategias de ingeniería genética.....	225
4B.5 Herramientas y aplicaciones basadas en fagos de bacterias lácticas	227
4B.5.1 Herramientas moleculares	227
4B.5.2 Agentes de biocontrol.....	228
4B.6 Conclusiones.....	229

Capítulo 5

Aplicaciones biotecnológicas.....	234
5.1 Introducción.....	234

Capítulo 5A

Prebióticos	237
5A.1 Introducción.....	237
5A.2 Características.....	238
5A.3 Clasificación	239
5A.3.1 Prebióticos sintéticos.....	239
5A.3.2 Prebióticos naturales	241
5A.4 Subproductos agroindustriales como fuente de fibra	245
5A.5 Incorporación de fibra dietética en productos cárnicos	246
5A.6 Conclusiones.....	247

Capítulo 5B

Probióticos y moléculas terapéuticas.....	252
5B.1 Introducción.....	252
5B.2 Enzimas	253
5B.3 Moléculas con actividad protectora frente a patógenos	255
5B.4 Moléculas con actividad moduladora del sistema nervioso central	257
5B.5 Moléculas con actividad antioxidante.....	259
5B.6 Moléculas con actividad inmunomoduladora/anti-inflamatoria.....	261
5B.7 Expresión de moléculas heterólogas de interés terapéutico	265
5B.8 Conclusiones.....	270

Capítulo 5C

Uso de bacterias lácticas como vehículos de moléculas terapéuticas	273
---	-----

5C.1	Introducción.....	273
5C.2	Bacterias lácticas como vehículos de antígenos y citosinas a nivel de mucosas.....	275
5C.3	<i>Lactococcus lactis</i> como vehículo de proteína de interés medio	276
5C.4	Producción heteróloga de proteínas en <i>L. Lactis</i>	276
5C.5	Uso de lactococos recombinantes para inducir una respuesta inmune sistémica y mucosal contra patógenos bacterianos y virales.....	278
5C.6	Uso de lactococos recombinantes para tratar la alergia causada por la B-Lactoglobulina bovina	279
5C.7	Efectos de la administración intranasal de una cepa recombinante de <i>L. Lactis</i> que produce y secreta la leptina humana en ratones obesos ob/ob	280
5C.8	Respuesta inmune contra antígenos expresados por <i>Lactobacillus</i> SPP.	281
5C.9	Conclusiones.....	281

Capítulo 5D

	Aplicaciones de los exopolisacáridos producidos por BAL en la calidad y funcionalidad de los alimentos.....	295
5D.1	Introducción.....	295
5D.2	Tipos de exopolisacáridos y su estructura	297
5D.3	Influencia de los exopolisacáridos en las propiedades organolépticas de los alimentos.....	301
5D.4	Contribución de los exopolisacáridos a la funcionalidad.....	304
5D.4.1	Los exopolisacáridos como prebióticos	305
5D.4.2	Contribución de los exopolisacáridos al carácter probiótico y a la capacidad inmunomoduladora de las bacterias lácticas.....	306
5D.5	Conclusiones.....	309

Capítulo 5E

	Agentes de conservación de los alimentos	313
5E.1	Introducción.....	313
5E.2	Producción de sustancias antibacterianas	314
5E.3	Producción de sustancias con actividad antifúngica	316
5E.4	Empleo de las bacteriocinas como bioconservantes.....	317
5E.4.1	Incorporación de bacteriocinas en los alimentos.....	318
5E.4.2	Bacteriocinas y tecnología de barreras	320
5E.5	Aplicaciones en alimentos y bebidas.....	325
5E.6	Conclusiones.....	328

Índice analítico	331
-------------------------------	-----

INTRODUCCIÓN

Victor M. Rivera¹ y Djamel Drider²

¹ *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana – Xalapa, Circuito Aguirre Beltrán S/N, Zona Universitaria, 91000, Xalapa, Ver. México.*

² *Laboratoire régional de recherche en agroalimentaires et biotechnologies: Institut Charles Viollette Cité Scientifique, Avenue Paul Langevin Batiment Polytech-Lille (bureau C315) 59655 Villeneuve d'Ascq, France.*

Los microorganismos son seres vivos o sistemas biológicos que solo pueden ser apreciados por el ojo humano a través de un microscopio. A diferencia de las plantas y animales, éstos están dotados de propiedades individuales con una organización biológica elemental; en su gran mayoría son de tipo unicelular, pero también existen los organismos de tipo cenóticos compuestos por células multinucleadas o incluso multicelulares. Los microorganismos están representados por cuatro grupos: bacterias, protozoos o también llamados protozoarios, hongos y algas.

Hacer clasificaciones sobre microorganismos buenos o malos carece de sentido real, puesto que todos participan en el reciclaje de las moléculas del mundo orgánico así como en la conservación de una parte de la ecología; de tal forma que son indispensables preservar la vida como la conocemos actualmente.

En la industria bioquímica (alimenticia, farmacéutica, biotecnológica, etc.) los microorganismos son utilizados de manera recurrente; esto debido a que pueden producir compuestos de alto valor agregado por vías más sencillas o económicas que empleando las técnicas químicas usuales. En otros casos, los microorganismos son cultivados por su valor intrínseco, como es el caso de la levadura empleada en la panadería; sin embargo, la mayoría de los casos se basa en la búsqueda de una sustancia que sea producto de su metabolismo, tal como en las industrias vinícolas o cerveceras.

De estos microorganismos, las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), han sido empleadas a lo largo de la historia para múltiples procesos. Sus diversas aplicaciones hacen de estas bacterias una importante área de estudio tanto para investigadores como estudiantes de distintos grados.

En este libro se presentan tanto los fundamentos como los avances recientes en torno a las BAL. Cada uno de los capítulos aquí presentados es redactado por grupos de investigadores líderes en el tema, quienes complementan sus avances científicos con los más sobresalientes en años recientes.

La organización de esta obra se hace en 5 principales secciones. En la primer sección (Capítulo 1) se da una introducción detallada así como los fundamentos de las bacterias ácido lácticas (BAL), aquí mismo se detallan sus principales aplicaciones de manera general así como los avances recientes con respecto a las mismas. Posteriormente en el capítulo 2 se realiza una revisión de las metodologías disponibles para identificar a las BAL, atendiendo a los objetivos que hacen necesaria su identificación.

Los últimos tres capítulos se dividen en subsecciones con el objetivo de profundizar en los temas ya presentados. En el capítulo 3 se describen los fundamentos, aplicaciones y desarrollos científicos recientes de los principales géneros de las BAL: *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Oenococcus* y *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Lactosphaera*, *Weissella*, entre otros.

En el capítulo 4 se presenta una revisión de las técnicas actuales de manipulación genética y los fagos que afectan a las BAL. De manera primordial se reflejan los principales sistemas de expresión génica del *Lactococcus lactis*; de la misma forma, se incluyen ejemplos acerca de las herramientas de transposición que han permitido una manipulación cromosómica de las BAL. Para posteriormente detallar la importancia de la acción de los fagos en la industria de las fermentaciones alimenticias incluyendo una reseña de su clasificación taxonómica, morfología y ciclo biológico.

Por último en el capítulo 5 se hace una recopilación bibliográfica de las aplicaciones biotecnológicas benéficas para el ser humano que presentan estos microorganismos, como son: aplicaciones prebióticas, probióticas y como moléculas terapéuticas. Para terminar con su aplicación en la industria alimentaria como agentes conservantes, aditivos de calidad y funcionalidad de los alimentos.

Los contenidos aquí presentados son una fuente de información actualizada y de relevancia para investigadores y académicos que desarrollen trabajos en torno al tema.

Djamel y Rivera

FUNCIONES GENERALES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

1

Miguel Ángel Fernández-Fuentes^{1,2}, María Guadalupe Méndez³, Elena Ortega-Morente¹, Antonio Galvez¹, Djamel Drider²

¹ Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, Campus las Lagunillas s/n, 23071 Jaén, España.

² Laboratoire des Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien (ProBioGEM), UPRES-EA 1026, Polytech'Lille/IUTA, Université Lille Nord de France, Avenue Paul Langevin, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

³ Departamento de Procesos Alimentarios, Universidad Tecnológica del Centro de Veracruz, Av. Universidad No. 350 Carretera Federal Cuitláhuac-La Tinaja, Localidad Dos Caminos, CP. 94910, Cuitláhuac, Ver. México.

1.1 INTRODUCCIÓN

Definición

El término bacterias lácticas (BAL) engloba a un grupo heterogéneo de microorganismos cuya característica definitoria es la producción de ácido láctico a partir de la fermentación de azúcares. Las BAL se han venido utilizando inadvertidamente durante miles de años para la producción de alimentos como son queso y yogur.

Las BAL son un grupo de bacterias Gram-positivas, ácido tolerantes que tienen similitudes morfológicas, metabólicas y fisiológicas, estrechamente relacionadas filogenéticamente. Son microorganismos que no forman esporas, inmóviles, cocos o bacilos. Generalmente se encuentran en plantas y productos lácteos en descomposición produciendo ácido láctico como producto metabólico final de la fermentación de carbohidratos. Esta particularidad ha enlazado históricamente a las BAL con la producción de alimentos fermentados, ya que la acidificación que producen inhibe el crecimiento de los agentes que causan descomposición. Algunas BAL son productoras de bacterocinas, proveyendo un obstáculo adicional para los microorganismos patógenos.

La clasificación de las BAL se basa principalmente en la morfología, el modo de fermentación de la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la configuración del ácido láctico producido, capacidad de crecer a altas concentraciones de sal y la tolerancia ácida o alcalina.

Los géneros básicos que comprenden las BAL son *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, aunque recientes revisiones taxonómicas han propuesto la inclusión de otros géneros, como *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, y *Weissella*. *Lactobacillus*, *Carnobacteria* y alguna especie de *Weissella* son bacilos, mientras que el resto de géneros son cocos.

Las BAL son microorganismos que presentan una cierta dualidad en los alimentos: por una parte actúan como agentes alterantes de los mismos y por otra parte presentan una acción beneficiosa proporcionando sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, utilizándose en la industria alimentaria como bioconservantes debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias con acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos.

1.2 LAS BAL COMO MICROORGANISMOS ALTERANTES

La descomposición de los alimentos es consecuencia de la actividad de los microorganismos presentes, de la composición del alimento, del tiempo y de las condiciones en las que son almacenados. El proceso de descomposición difiere en función de la acción microbiana predominante sobre las proteínas, lípidos o carbohidratos provoca cambios distintos, aun tratándose del mismo alimento (Fernández, 2000).

Las BAL están implicadas en la descomposición o deterioro de la carne, las verduras, vinos, la leche y otros productos de consumo diario, originando cambios en la composición de algunos alimentos y provocando un mal sabor, olores desagradables, acidez y turbidez. Algunos son el agriado en productos lácteos, frutas y alimentos perecederos, espesamiento en productos que contienen líquidos azucarados (almíbares) o mucosidad y enverdecimiento de embutidos (Fernández, 2000).

La alteración de la leche y productos lácteos por el crecimiento de BAL tiene lugar cuando las temperaturas de almacenamiento son lo suficientemente altas como para permitir que las BAL se multipliquen o cuando la composición del producto inhibe el crecimiento de las bacterias Gram-negativas aerobias. Así, la presencia de ácido láctico en leche es un buen indicador de que este fluido se ha expuesto a temperaturas de almacenamiento inaceptablemente elevadas ya que permitieron el crecimiento de bacterias lácticas. La acidificación de la leche por bacterias lácticas produce un olor y sabor desagradables, que derivan fundamentalmente de las pequeñas cantidades de ácido acético y propiónico formadas,

más que del ácido láctico, que es el metabolito mayoritario. Otros defectos que pueden aparecer son el sabor “malteado”, debido al crecimiento de ciertas cepas de *Lactococcus lactis* capaces de producir 3-metil-butanal, 2-metil-butanal y los correspondientes alcoholes, y la aparición de viscosidad, debido a la producción de exopolisacáridos (Rodríguez, 2010).

Los productos cárnicos son excelentes sustratos para el desarrollo de los microorganismos alterantes, debido a la suma de una serie de factores favorables, como pH un poco ácido, alta actividad de agua y disponibilidad de nutrientes. Aunque las proteasas musculares están implicadas en la descomposición inicial de las proteínas de la carne y son los agentes principales de la proteólisis durante los primeros días de fermentación, las BAL están dotadas de actividad proteolítica, principalmente intracelular amino, di- y tripeptidasas (Sanz y Toldrá, 2002).

Las BAL son un recurso esencial en la industria alimentaria como iniciadores de la fermentación. Sin embargo, la actividad metabólica de algunas cepas puede dar lugar a la formación de sustancias tóxicas como las aminas biógenas (AB). Estos compuestos nitrogenados de bajo peso molecular se forman por descarboxilación de determinados aminoácidos (Silla, 1996). La ingesta de alimentos con niveles altos de AB puede ocasionar graves trastornos, llegando incluso a comprometer la vida del consumidor, especialmente en aquellas personas con deficiencias en la actividad amino-oxidasa intestinal, enzima responsable de su destoxificación (Bodmer *et al.*, 1999). Además, las AB son precursoras de las nitrosaminas, de conocido efecto cancerígeno. En general, las AB que aparecen con mayor frecuencia y en mayor concentración en alimentos fermentados son la tiramina y la histamina, producidas por descarboxilación enzimática de los aminoácidos tirosina e histidina respectivamente (Ten Brink *et al.*, 1990).

1.3 LAS BAL COMO MICROORGANISMOS BENEFICIOSOS

La fermentación es el método más antiguo de conservación de alimentos y bebidas que existe. Los alimentos fermentados son parte de la dieta de la población mundial y hay muchos ejemplos de productos fermentados preparados utilizando BAL como cultivos iniciadores que muestran variaciones en las materias primas, la formulación y el proceso de fabricación dependiendo de las costumbres y hábitos de los diferentes países y regiones.

Las BAL son empleadas en la fabricación y conservación de alimentos, y, a pesar de su importancia económica, no siempre han recibido la atención necesaria por parte de los microbiólogos ni del sector industrial. El desarrollo de la industria agroalimentaria y en particular la utilización de materias primas nuevas, así como la necesidad de crear nuevos productos explica el interés creciente hacia este grupo de bacterias (Leveau y Bouix, 2000).

Como beneficio adicional, muchas BAL son consideradas por la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) como seguras para su uso en los

alimentos (GRAS: Generalmente Reconocida como Segura) y los péptidos antimicrobianos producidos por ellos se descomponen fácilmente por las proteasas digestivas, sin afectar la microbiota intestinal (Castellano *et al.*, 2008).

El desarrollo de las industrias de transformación conduce a la producción industrial de BAL para emplearlas como cultivos iniciadores para la elaboración de productos alimenticios fermentados como el yogur, leches, mantequillas, quesos madurados, col agria, encurtidos, embutidos y bebidas alcohólicas, donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los mismos. Las BAL también contribuyen en la biopreservación de los alimentos y mejoran las características sensoriales como el sabor, olor, textura y aumentan su calidad nutritiva. Igualmente la mayoría de los probióticos (cultivos puros, o mezcla de cultivos de microorganismos vivos, que al ser consumidos por el hombre y los animales en cantidades adecuadas mejoran su salud) pertenecen a las BAL y son usados por la industria alimentaria en la elaboración de productos fermentados y como complementos alimenticios con la finalidad de promover la salud.

1.4 FERMENTACIÓN DE ALIMENTOS

La aplicación de BAL tiene dos objetivos en los alimentos fermentados. En primer lugar, en el desarrollo de sabores y olores característicos durante la fermentación; y, segundo para inhibir la microflora competitiva mediante la reducción del pH del medio. De este modo, las BAL tienen un papel fundamental en la conservación de alimentos fermentados provocando cambios en las características sensoriales, además de su acción preservativa (Holzapfel *et al.*, 1995). De hecho, una de las funciones principales de las BAL en la industria alimentaria es el empleo de las mismas como cultivos iniciadores en alimentos fermentados. Un cultivo iniciador se definiría como aquel formado por una o varias cepas de bacterias activas, capaces de multiplicarse en un alimento para propiciar la acidificación rápida del medio donde producen cambios específicos en el aroma, sabor, textura, cuerpo, acidez, humedad, digestibilidad y aspecto de los alimentos.

1.5 DEFINICIÓN DE ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados se definen como aquellos sustratos de alimentos que son invadidos o cubiertos por microorganismos comestibles cuyas enzimas, particularmente amilasas, proteasas y lipasas hidrolizan los polisacáridos, proteínas y los lípidos en productos no tóxicos con sabores, aromas y texturas agradables y atractivos para el consumidor. Si los productos resultantes de esta actividad de las enzimas tienen olores desagradables o indeseables, sabores desagradables o los productos son tóxicos o producen enfermedad, entonces los alimentos se describen como en mal estado (Steinkraus, 1995, 1996, 1997).

La fermentación cumple diversas funciones en el procesamiento de alimentos:

- El enriquecimiento de la dieta humana a través del desarrollo de una gran diversidad de sabores, aromas y texturas en los alimentos.
- La preservación de importantes cantidades de alimentos a través del ácido láctico, acético, o las fermentaciones alcalinas.
- Enriquecimiento biológico de sustratos alimenticios con vitaminas, proteínas, aminoácidos esenciales y ácidos grasos esenciales.
- Desintoxicación durante el procesamiento de alimentos y fermentación.
- Una disminución en los tiempos de cocción y las necesidades de combustible.

1.6 FERMENTACIÓN DE LA LECHE

Las BAL transforman la lactosa de la leche en ácido láctico, lo que modifica la estructura de las proteínas de la leche (cuajan). De esta manera se modifica la textura del producto, aunque existen otras variables, como la temperatura y la composición de la leche, que influyen en las cualidades de los distintos productos resultantes. El ácido láctico le confiere a la leche fermentada ese sabor ligeramente acidulado, y otros derivados de la fermentación producen a menudo otros sabores o aromas. El acetaldehído, por ejemplo, da al yogurt su aroma característico, mientras que el diacetilo confiere un sabor de manteca a la leche fermentada. Pueden agregarse levaduras a la fermentación, como es el caso del kefir, el kumis y el leben (variedades de yogurt), donde el alcohol y el dióxido de carbono producidos por la levadura dan una frescura y una textura características. Entre otras técnicas empleadas cabe mencionar las que consisten en eliminar el suero o añadir sabores, que permiten crear una variada gama de productos.

Con respecto al yogurt, en su elaboración se emplean dos bacterias: *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus*, que se caracterizan porque cada una estimula el desarrollo de la otra. Esta interacción reduce considerablemente el tiempo de fermentación y el producto resultante tiene peculiaridades que lo distinguen de los fermentados con una sola cepa de bacteria.

Además de su empleo en la elaboración del yogurt y otros productos, las bacterias ácido lácticas son explotadas como cultivos probióticos, ya que se complementan con las bacterias presentes en nuestra flora intestinal y contribuyen al buen funcionamiento del aparato digestivo.

Las principales funciones de las bacterias lácticas en los productos lácteos son las siguientes (Barbosa *et al.*, 2006):

- La producción de ácido láctico que provoca la disminución del pH, factor importante para el sabor y, además, coagula las caseínas (principales

proteínas de la leche) con lo cual se desarrolla la textura de productos como quesos y leches fermentadas.

- La producción de metabolitos como diacetilo, acetoína y acetaldehído, que aportan el aroma y sabor característicos de todos los productos lácteos fermentados.
- La hidrólisis de las proteínas de la leche, función productora de los fragmentos (péptidos) que contribuyen al sabor (particularmente en quesos madurados), los cuales pueden tener ciertas actividades farmacológicas (es decir, pueden ayudar a resolver problemas de salud como disminuir la presión arterial, prevenir la formación de trombosis, brindar un efecto ansiolítico y relajante, así como modular el sistema inmune, entre otras).

En la elaboración de crema y mantequilla, una ligera acidificación permite acelerar el proceso y aumenta el rendimiento. Además, algunas especies producen polisacáridos que aumentan la viscosidad de la leche, cambiando su textura. También portan sabor y textura: el diacetilo es el principal responsable del aroma de la mantequilla; la acetoína lo es en el yogurt, mientras que el ácido láctico aporta sabor a diversos productos fermentados. Además la producción de enzimas que intervienen en el afinado de los quesos por degradación de las proteínas y las grasas afectan notablemente las características organolépticas de los mismos. Igualmente ejercen efectos bioprotectores manifestados en la prolongación de la vida útil de los productos elaborados con sus cultivos.

La capacidad de producir enzimas proteolíticas es una característica muy importante para las BAL presentes en la leche. Este alimento contiene pequeñas cantidades de aminoácidos libres y el sistema proteolítico de estos microorganismos es fundamental para la obtención de los aminoácidos esenciales para su multiplicación (Lozo *et al.*, 2011). Se sabe que las BAL tienen un sistema proteolítico complejo que implica la acción de proteinasas, peptidasas y enzimas de transporte (Bu *et al.*, 2010). Además, la proteólisis es considerada uno de los procesos bioquímicos más importantes que intervienen en la fabricación de productos lácteos fermentados, que contribuye al desarrollo de las características sensoriales de los productos (di Cagno *et al.*, 2003, Chaves-López *et al.*, 2011).

Durante la fermentación de la leche, las enzimas bacterianas proteolíticas descomponen las proteínas más grandes, provocando el aumento de la digestibilidad del sustrato y la liberación de péptidos bioactivos. Además, estos microorganismos también pueden actuar reduciendo las reacciones alérgicas a través de mecanismos de regulación inmune (Bu *et al.*, 2010).

1.7 FERMENTACIÓN DE LA CARNE

Las bacterias BAL son agentes esenciales durante la fermentación de la carne y la mejora de la calidad sensorial del producto final. Su metabolismo fermentativo impide el deterioro y desarrollo de la microflora patógena por acidificación del producto, contribuyendo a la estabilización del color y mejora de la textura.

Los principales microorganismos responsables de la fermentación de los productos cárnicos se dividen en dos grupos: las BAL y los cocos Gram-positivos coagulasa negativo (Aymerich *et al.*, 2003; Papamanoli *et al.*, 2003; Rantsiou *et al.*, 2005; Talon *et al.*, 2007). Las BAL en los procesos de fermentación son responsables de la producción de ácido láctico, que contribuye al sabor característico y pueden producir compuestos antimicrobianos, tales como bacteriocinas (Deegan *et al.*, 2006; Najjari *et al.*, 2008). Los cocos Gram-positivos coagulasa negativo contribuyen a la aparición y la estabilidad de la coloración roja a través de la acción de la nitrato reductasa. Además, la reducción de nitrato a nitrito por estas bacterias contribuye a la disminución en la oxidación de lípidos (Rantsiou *et al.*, 2005).

El sabor típico de los embutidos y encurtidos fermentados es el resultado de un equilibrio entre compuestos volátiles (alcohol, cetonas, aldehídos y furanos) y compuestos no volátiles (aminoácidos, péptidos, azúcares y nucleótidos) procedentes de las materias primas (carne, especias, nitritos y otros aditivos) o generados a partir de las reacciones bioquímicas que se producen durante la fermentación y maduración (Flores *et al.*, 1997; Toldrá, 1998; Stahnke, 2002). Los componentes no volátiles proporcionan sabores básicos, como dulce, agrio, salado y amargo. Muchos compuestos no volátiles tales como péptidos y aminoácidos que están implicados en el desarrollo del sabor característico se producen durante la hidrólisis de las proteínas de la carne. En este sentido, en la fermentación de la carne las BAL tienen una participación directa o indirecta sobre este fenómeno, por lo que su presencia determina en gran medida las características sensoriales del producto final.

En la etapa de fermentación de los productos cárnicos se produce el cambio en las propiedades bioquímicas y físico-químicas que determinan las características sensoriales del producto final, especialmente de textura y sabor. La participación de diferentes microorganismos en los procesos de fermentación genera productos con distintas características sensoriales. Así, el conocimiento y el control de la microbiota presente en la materia prima durante el proceso son esenciales para garantizar la calidad microbiológica y la estandarización de las características sensoriales del producto final (Aymerich *et al.*, 2003; Rantsiou *et al.*, 2005).

1.8 FERMENTACIÓN DE VEGETALES

Entre las diversas opciones tecnológicas, la fermentación ácido láctica puede considerarse como una biotecnología sencilla y valiosa para mantener y/o mejorar la seguridad, calidad nutricional y sensorial y tiempo de conservación de las propiedades de los vegetales (Steinkraus, 1996; Buckenhüskes, 1997).

La fermentación láctica de verduras tiene hoy en día una gran importancia industrial sólo para pepinos, coles y aceitunas (Montet *et al.*, 2006). Otras variedades de vegetales cultivadas en el área mediterránea como zanahorias, calabacines, alcachofas, alcaparras, berenjenas, etc. podrían aumentar su seguridad, valor nutricional y sensorial y vida útil si se estandariza de forma industrial la fermentación láctica.

Al producirse de forma espontánea, la fermentación de vegetales se caracteriza frecuentemente por una sucesión de BAL hetero y homo-fermentativas, junto con o sin levaduras, que son responsables de varios pasos procesos de fermentación. Sin embargo, en algunos casos la fermentación espontánea del ácido láctico puede ser responsable de las variaciones indeseables de las propiedades sensoriales de las hortalizas frescas y/o puede ocurrir tan rápidamente que no inhiba el deterioro y los microorganismos patógenos (Buckenhüskes, 1997).

1.9 FERMENTACIÓN DE BEBIDAS

Dos grupos clave de organismos están involucrados en la producción de vino tinto, blanco y espumoso (Nannelli *et al.*, 2008). Las levaduras, fundamentalmente cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, llevan a cabo la fermentación alcohólica primaria, en la cual los azúcares se convierten en etanol y dióxido de carbono. Las BAL llevan a cabo la segunda fermentación o maloláctica del vino por la descarboxilación de ácido L-málico a ácido L-láctico y dióxido de carbono. Además de estas dos reacciones cruciales en la vinificación de la uva, se produce otro gran número de cambios para completar la transformación del zumo de uva en vino. Los compuestos que estimulan nuestros sentidos visuales, olfativos, gustativos y táctiles se deben a las modificaciones que se producen durante la vinificación. Muchos de estos procesos implican la acción de enzimas (García-Ruiz *et al.*, 2008) que pueden proceder de las bacterias que se encuentran en las propias uvas, o bien de los microorganismos inoculados o asociados con el equipo de la bodega y los tanques de almacenamiento en los que se conserva el vino durante su producción.

Las BAL del vino también pueden producir polisacáridos extracelulares que pueden ser de distinta naturaleza química: dextrano, levanos, glucanos o heteropolisacáridos. La presencia de estos polisacáridos en el vino hace que éste se vuelva más viscoso (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000).

Los principales ácidos orgánicos presentes en los mostos son ácido tartárico, ácido málico y ácido cítrico; también se encuentran los ácidos ascórbico y glucónico aunque en cantidades menores que los anteriores (Cabanis *et al.*, 2000). Como consecuencia de la actividad microbiana durante la fermentación, otros ácidos como el pirúvico, L o D-láctico, succínico, acético, citramálico, oxalacético y fumárico pueden aparecer. Las BAL degradan mayoritariamente el ácido málico y el ácido cítrico y, con mucha menor frecuencia, el ácido tartárico. La capacidad para degradar los dos primeros ácidos está muy extendida entre las especies que proliferan tras la fermentación alcohólica y esta degradación provoca numerosos e importantes cambios organolépticos en el vino.

La cerveza constituye un medio poco adecuado para el desarrollo de las bacterias, por lo que el número de géneros y especies que la contaminan ordinariamente es limitado. Al igual que las levaduras salvajes, las bacterias contaminantes provocan turbidez y generan olores y bouquets anómalos. Las únicas bacterias Gram-positivas que causan problemas graves en el ambiente de las factorías elaboradoras de cerveza son las BAL (Hough, 1990).

En cuanto a las alteraciones que las BAL pueden producir en la elaboración de sidra, destacan: la acetificación, por contenidos elevados de ácido acético en la sidra y superiores a lo legalmente establecido; el picado acroléico o amargor, por producción de acroleína a partir de la metabolización de la glicerina por la acción de BAL (también se forman otros productos secundarios como acetoina, diacetilo y ácido acético provenientes de la metabolización del ácido pirúvico) y el ahilado o enfermedad de la grasa (Dueñas *et al.*, 1995), caracterizado por el aumento de la viscosidad y la consistencia de las bebidas, como consecuencia de la producción de exopolisacáridos por diferentes estirpes de BAL. El ahilado también ha sido descrito en vino (Lonvaud-Funel, 1999) y cerveza (Van Oevelen y Verachtert, 1979).

1.10 BIOPRESERVACIÓN DE ALIMENTOS

La bioconservación es una tecnología que tiene por objetivo extender la vida útil y la seguridad de los alimentos mediante el uso de microorganismos o sus productos metabólicos que poseen propiedades antimicrobianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, enzimas y bacteriocinas (Lücke, 2000; Greer y Dilts, 2006; Castellano *et al.*, 2008).

Como conservadores biológicos, las BAL no tienen bien definido el mecanismo específico por el que inhiben a otros microorganismos. En su desarrollo producen gran variedad de metabolitos, de modo que la inhibición es un efecto de la acción conjunta de todos estos productos.

Las metodologías de biopreservación con BAL más comúnmente utilizadas en alimentos son la aplicación de cepas productoras de sustancias antagónicas

denominadas cepas biopreservantes, la utilización de preparaciones como extracto crudo de bacteriocinas, licor fermentado o concentrados obtenidos mediante el crecimiento de cepas biopreservantes en medios de cultivo específicos y la adición de sustancias antagonistas puras o semipuras como las bacteriocinas producidas por BAL (Chen y Hower, 2003).

Diferentes estudios han aplicado la biopreservación mediante el uso de una microbiota natural como BAL aisladas de productos lácteos, cárnicos, pescados y vegetales, utilizando las propiedades antibacterianas atribuidas a los productos finales de su metabolismo como ácido láctico, acético, peróxido de hidrógeno, diacetaldehído, reuterina y bacteriocinas (Hugas *et al.*, 1998).

El uso de las bacteriocinas en la industria de los alimentos puede ayudar a reducir la adición de preservantes químicos así como también la intensidad del tratamiento térmico.

1.10.1 Metabolitos producidos por las BAL

Las BAL producen sustancias que inhiben el crecimiento de otros microorganismos durante su crecimiento, utilizándose esta característica para la destrucción de bacterias no deseadas o patógenas en la elaboración de alimentos. Muchos de estos metabolitos no están aún caracterizados y con frecuencia, los productos activos son metabolitos excretados por la bacteria como el ácido láctico o derivados del metabolismo del oxígeno, como el peróxido de hidrógeno (Leveau y Bouix, 2000).

El uso de las BAL y de los metabolitos producidas por éstas, como las bacteriocinas, en forma de extractos crudos o purificados, ofrecen un potencial en la conservación de alimentos, siendo una alternativa en la industria de alimentos que podría ayudar a reducir la adición de conservantes químicos y disminuir la intensidad del tratamiento térmico, resultando en alimentos preservados naturalmente, con mejores propiedades nutricionales y organolépticas (Gálvez *et al.*, 2007).

La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las bacterias lácticas. No obstante, estas bacterias también producen otras sustancias antagonistas dentro de las cuales destacan los compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), compuestos no proteicos de bajo peso molecular (reuterina) y de alto peso molecular (bacteriocinas) (Klaenhammer, 1993; García *et al.*, 1995; Requena y Peláez, 1995; Dabes *et al.*, 2001). Entre otras sustancias antimicrobianas que pueden producir las BAL están los ácidos acético y propiónico y el dióxido de carbono.

Estos metabolitos producidos por las BAL cumplen distintas funciones en los alimentos:

- **Ácidos orgánicos:** Contribuyen al desarrollo de sabor, aroma y textura de los alimentos, pero también a su estabilidad mediante la inhibición de microorganismos alterantes. Dentro de los ácidos orgánicos se

encuentran el ácido láctico, ácido propiónico y el ácido acético. La fermentación por BAL se caracteriza por la acumulación de estos ácidos y por la disminución de pH del ambiente de crecimiento, contribuyendo a la inhibición de microorganismos. Existe una acción complementaria entre la disminución del pH y la actividad de los ácidos orgánicos, de naturaleza lipofílica, atravesando la membrana celular y disociándose en el citoplasma. Estos ácidos interfieren con las funciones celulares y al disociarse incrementan los protones en el interior celular, encadenándose una serie de acciones que acaban por colapsar el gradiente electroquímico de transporte de protones causando efectos bacteriostáticos y muerte de las bacterias más susceptibles (Requena y Peláez, 1995).

- **Peróxido de hidrógeno:** Funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA (Ho-Hyuk *et al.*, 2008). Se produce en presencia de oxígeno por las BAL a través de la acción de flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa. Su efecto antimicrobiano es debido a la desnaturalización de enzimas por la oxidación de los grupos sulfhidrilo y de la peroxidación de las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de las mismas. El peróxido de hidrógeno puede ser un precursor para la producción de radicales libres como son el superóxido e hidroxilo, que dañan el ADN (Adams y Moss, 1998; Yang, Z., 2000). La capacidad del peróxido de hidrógeno producido por las BAL para la conservación de alimentos es limitada porque existen muchos factores que intervienen, como la utilidad del oxígeno presente, la presencia de diferentes niveles de superóxido dismutasa y la catalasa. Además, la oxidación natural del peróxido de hidrógeno y los radicales libres que se forman como consecuencia, ejercen unos efectos muy notables en la calidad sensorial, causando el enranciamiento de las grasas y aceites, así como reacciones de decoloración y, bajo ciertas condiciones, producen aldehídos activos.
- **Dióxido de carbono:** Se produce principalmente por la vía heterofermentativa de las BAL. Se desconoce cómo actúa exactamente este compuesto, con cierto poder antimicrobiano producido por estas bacterias.
- **Compuestos aromáticos:** Diacetilo y acetaldehído. Estos compuestos proporcionan aroma y sabor. El diacetilo impide el uso de la arginina y el acetaldehído ejerce actividad antimicrobiana al encontrarse en concentraciones muy elevadas. La capacidad que presentan para otorgar aroma hace que el empleo de estos compuestos como conservantes no se extienda, ya que es más bajo el umbral de detección del aroma que el necesario para inhibir a los microorganismos.
- **Reuterina:** Sustancia antimicrobiana de bajo peso molecular que tiene un amplio espectro antimicrobiano contra bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas, mohos, levaduras, protozoos y virus.

- **Bacteriocinas:** Las bacteriocinas son un grupo heterogéneo de proteínas o péptidos, sintetizados ribosomalmente, que tienen una acción comprobada contra diversos microorganismos (Gálvez *et al.*, 2008; Todorov *et al.*, 2009). Estas sustancias inhiben la multiplicación de otras bacterias BAL genéticamente relacionadas, pero no tienen ninguna acción sobre sí mismas. Las células que producen estos péptidos antimicrobianos son inmunes a su propia bacteriocina por la presencia de una proteína de inmunidad específica a la bacteriocina producida por ellos (Arauz *et al.*, 2009; Asaduzzaman y Sonomoto, 2009).

Las bacteriocinas difieren de los antibióticos principalmente en su síntesis, espectro y modo de acción, toxicidad y mecanismos de resistencia (Deegan *et al.*, 2006; Todorov *et al.*, 2010), como se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.1 Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos, adaptado de Cleveland *et al.*, (2001).

Característica	Bacteriocinas	Antibióticos
Aplicación	Alimentos	Clínica
Síntesis	Ribosómica	Metabolitos secundarios
Actividad	Espectro limitado	Espectro más amplio
Auto-inmunidad	Si	No
Mecanismo de resistencia	Normalmente adaptación afectando la composición de la membrana celular	Normalmente un determinante genéticamente transferible
Modo de acción principal	Formación de poros	Dianas específicas
Toxicidad / Efectos colaterales	No conocidos	Si

Según la última clasificación propuesta por Heng *et al.* (2007), estos péptidos se pueden dividir en cuatro clases de acuerdo con la estructura y modo de acción: Péptidos clase I que contienen lantionina; Péptidos clase II pequeños (<10 kDa) no modificados; Péptidos clase III grandes proteínas mayores que 10 kDa y Péptidos clase IV proteínas cíclicas.

Muchas bacteriocinas actúan en células sensibles, desestabilizan y permeabilizan la membrana citoplasmática por medio de la formación de poros transitorios o canales iónicos que causan la disipación o reducción de la fuerza motriz de protones (FMP) de la célula debido a la interacción con polímeros aniónicos que constituyen la pared celular (Grande *et al.*, 2005). Esto provoca el colapso del eflujo de los componentes celulares y priva a las células de su fuente de

energía esencial (Ammor y Mayo, 2007; Arauz *et al.*, 2009). La FPM controla la síntesis de ATP y la acumulación de iones y otros metabolitos dentro de las células, y su colapso produce la detención de todas las reacciones que requieren energía, lo que conduce a la muerte celular. Estos cambios ocurren en dos etapas: la primera es la adsorción de la bacteriocina a la membrana celular, que no produce cambios permanentes en la célula, ya que la adsorción es reversible; en la segunda etapa, la bacteriocina penetra en la membrana celular causando cambios irreversibles letales para la célula (Chatterjee *et al.*, 2005; Arauz *et al.*, 2009).

Las bacteriocinas para uso en la industria alimentaria deben cumplir una serie de requisitos de bacteriocinas para uso en industria alimentaria:

- Ser producidas por bacterias de grado alimentario.
- Ser termorresistentes.
- Tener actividad inhibidora de bacterias patógenas o alterantes del alimento.
- No deben llevar asociado ningún riesgo para la salud humana
- Su adición debe conllevar un efecto beneficioso, como puede ser un aumento de la seguridad, la calidad o la conservación del aroma y propiedades organolépticas del alimento, y nunca se han de adicionar en concentraciones superiores a las encontradas en sus fuentes naturales.
- Poseer una actividad altamente específica y actuar únicamente contra bacterias patógenas o alterantes.

Las bacteriocinas se pueden utilizar en los alimentos de diferentes maneras. En los alimentos fermentados, la bacteriocina se puede producir “in situ” por cultivos bacterianos, que pueden sustituir total o parcialmente al cultivo iniciador, pero es necesario asegurar que las bacterias son capaces de crecer en el sustrato al que se añaden. También se puede añadir bacteriocina purificada o semipurificada directamente a los alimentos, o bien añadir una cepa productora de bacteriocina a través de un ingrediente fermentado (Cotter *et al.*, 2005; Gálvez *et al.*, 2007).

1.11 BACTERIAS LÁCTICAS PROBIÓTICAS

El comité de expertos de la FAO/OMS define los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del consumidor. De acuerdo con este concepto, las cepas deben mantener la viabilidad desde la producción hasta su consumo. Además, es deseable que las cepas mantengan su viabilidad durante el tránsito a través del tracto gastrointestinal, para lo que se requiere que sean resistentes al pH gástrico y a la presencia de sales biliares en el duodeno (Del Piano *et al.*, 2006; Pineiro y Stanton, 2007). Se han establecido ciertas características que deben reunir estos microorganismos para asegurar su eficiencia, eficacia y beneficio para el hospedador. Entre estas características se encuentran: no ser patógeno, ni tóxico,

estabilidad al contacto con bilis y ácido o adhesión a la mucosa intestinal (Shah, 2000).

Los principales probióticos utilizados para consumo humano son BAL empleadas tradicionalmente en fermentaciones alimentarias o procedentes de aislados intestinales.

Los probióticos se utilizan en la industria alimentaria para la elaboración de “alimentos probióticos” que son aquellos a los que se les han añadido microorganismos que benefician la salud del hospedador, manteniendo un equilibrio en la microbiota intestinal.

Los microorganismos probióticos producen sustancias antimicrobianas como ácidos láctico y acético, que por medio de la acidificación del intestino ayudan a inhibir la proliferación de algunos microorganismos patógenos; así mismo son fuente de metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (Savadojo *et al.*, 2006).

Las BAL que se utilizan como probióticos se seleccionan en base a una serie de requisitos que éstas deben poseer. En particular hay que considerar:

- La seguridad biológica: no deben causar infecciones de órganos o de sistemas;
- La capacidad de ser toleradas por el sistema inmunitario del organismo huésped, y, por lo tanto, deben ser preferiblemente de proveniencia intestinal;
- La capacidad de resistir la acción de los ácidos gástricos y de las sales biliares para llegar viables en grandes cantidades al intestino (10^7 UFC por gramo de alimento). Las condiciones ácidas, sales biliares o variaciones de pH afectan a la viabilidad de los microorganismos y es necesario que lleguen vivos al final del intestino para poder ejercer efectos inmunomoduladores (Ramasamy *et al.*, 2010);
- La capacidad de adherirse a la superficie de la mucosa intestinal y de colonizar el segmento gastrointestinal (pre-requisito para que el probiótico sea efectivo y desarrolle sus efectos inmunomoduladores, reduzca la adhesión de microbiota competitiva y desarrolle la actividad antimicrobiana que favorece el desplazamiento de patógenos);
- La sinergia con la microflora endógena normal;
- El efecto barrera: este término define la capacidad de producir sustancias que tengan una acción trófica sobre el epitelio de la mucosa intestinal;
- La capacidad de potenciar las defensas inmunitarias del huésped.

1.11.1 Efectos/beneficios de los probióticos

Los probióticos también son conocidos como alimentos funcionales. Los alimentos funcionales son similares en apariencia a los alimentos convencionales que se consumen como parte de una dieta normal y han demostrado beneficios fisiológicos y/o reducción del riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones básicas de nutrición (Clydesdale, 1997).

El mayor potencial de aplicación de las BAL en la salud humana se basa en su capacidad de mejorar las enfermedades inmunológicas, tales como alergias, cáncer o enfermedades inflamatorias intestinales. Además, varios estudios científicos indican que el consumo regular de probióticos puede restaurar/mantener el equilibrio microbiano en el tracto gastrointestinal, urogenital y respiratorio, de gran importancia para prevenir la colonización de estos nichos por bacterias patógenas. La biotransformación de compuestos nocivos en el tracto gastrointestinal a compuestos menos nocivos y la producción de otros compuestos útiles, tales como vitaminas y ácidos grasos de cadena corta por BAL produce una mejora de la salud. El fuerte efecto inhibitorio contra el crecimiento y la producción de toxinas de la mayoría de otras bacterias se propuso como una de las formas en que las BAL impiden la colonización de nichos ecológicos dentro del cuerpo humano. La actividad antagonista puede ser un resultado de la competencia por los nutrientes disponibles, la disminución de potencial redox, la producción de ácido (ácido láctico y ácido acético), resultando en una disminución del pH, producción de metabolitos inhibitorios (peróxido de hidrógeno y diacetilo) y la producción de compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas y los antibióticos (Kalantzopoulos, 1997).

1.11.2 Seguridad de los probióticos

Las BAL constituyen, por definición, un tipo de bacterias que tienen efectos beneficiosos para la salud humana, tienen un buen historial en cuanto a su seguridad y una larga historia de uso seguro, pero la ingesta de un elevado número de microorganismos viables obliga a investigar su seguridad. Desde un punto de vista teórico, al tratarse de microorganismos que normalmente forman parte de nuestra flora comensal, difícilmente podrían causar problemas infecciosos. Para garantizar la seguridad de las cepas probióticas, se recomiendan las siguientes pruebas de caracterización (FAO y OMS, 2001):

- Perfiles de resistencia a antimicrobianos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles.
- Actividades metabólicas perjudiciales.
- Estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores.
- Determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente toxigénica.
- Ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.

- Determinar la dosis y la duración de la terapia.
- Realización de pruebas aleatorias, ensayos en diferentes centros, doble ciego, controlado con placebo y con un apropiado diseño estadístico.