



Universidad de Zaragoza

Facultad de Veterinaria

Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos



Estudio de propiedades de interés
probiótico y tecnológico de dos cepas
de *Lactobacillus plantarum*

María Cermeño Ainsa

Máster en Iniciación a la Investigación en
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Trabajo fin de Máster dirigido por: Pilar Mañas Pérez
04-Julio-2012

AGRADECIMIENTOS

Debo agradecer a mi directora Pilar Mañas por permitirme realizar este trabajo con ella, por transmitirme su conocimiento en la materia y por ayudarme durante todos estos meses.

Gracias a todos los profesores del máster, ya que en mayor o menor grado, han contribuído a mi formación académica y personal.

Gracias a todos mis compañeros del máster, porque todos me han sacado al menos una sonrisa y han amenizado esas interminables horas de trabajo. Sobre todo, gracias por las carcajadas a la hora de comer.

Gracias a mis compañeros/as de laboratorio, por toda la ayuda prestada
Gracias a Bea y Laura, que han sido mis compañeras de batalla

Especial mención para Carmen, por nuestras pequeñas charlas, por poner el autoclave, por aprender a grabar cds y porque se lo merece, gracias.

Gracias a mis padres, Pedro y Milagros, por su apoyo, porque creen en mí, por los momentos duros, porque siempre han sabido cuando darme un empujoncito en el momento adecuado, y por fin he aprendido a darlo yo misma.

Gracias a mis hermanos, Pedro y Sergio, porque son los dos, mis grandes modelos a seguir, porque admiro su constancia y esfuerzo en el trabajo y en aprender, porque ójala yo fuera como ellos.

Gracias a Enea, por todo y más. Milioni di rantantis!

RESUMEN

Lactobacillus plantarum es una bacteria ácido láctica de gran interés tanto probiótico como tecnológico. La capacidad probiótica de algunas cepas de *L. plantarum* ha sido ampliamente estudiada, habiéndose demostrado su capacidad de colonizar la mucosa intestinal. Por otro lado, es una de las principales especies involucradas en procesos de fermentación, sobre todo en productos de origen vegetal.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la influencia de las condiciones de crecimiento de *L. plantarum* en algunas características de interés para su posterior utilización como microorganismo probiótico. Asimismo se estudió la capacidad de fermentación de diversos azúcares, de interés tanto tecnológico como probiótico. Para ello se escogieron dos cepas, una caracterizada como cepa probiótica, y otra cepa aislada de un producto vegetal fermentado.

Los aspectos estudiados incluyeron una caracterización de la capacidad de crecimiento de ambas cepas bajo diferentes condiciones experimentales, lo cual nos permitiría escoger las condiciones más adecuadas para la obtención de cultivos de *L. plantarum* con tasas de crecimiento y densidades celulares elevadas.

Por otro lado se estudió la capacidad de supervivencia de *L. plantarum* frente a las dos barreras más importantes a las que se puede enfrentar en el tránsito gastrointestinal, el jugo gástrico y las sales biliares, y se evaluó la influencia sobre la misma de las condiciones de obtención del cultivo. Ello nos permitiría escoger las condiciones de crecimiento más adecuadas de acuerdo a criterios de aptitud probiótica evaluada *in vitro*.

Se estudió la capacidad antimicrobiana de ambas cepas frente a cuatro patógenos de interés, con el objetivo final de escoger las condiciones de crecimiento que favorecieran este carácter.

Por último se estudió la capacidad para utilizar diversos azúcares con objeto de prever la adecuación de diferentes materias primas como sustrato de fermentación y/o obtención del cultivo.

Los resultados obtenidos han mostrado que las dos cepas de *L. plantarum* fueron capaces de crecer bajo las diferentes condiciones experimentales utilizadas (aerobiosis, anaerobiosis, aerobiosis a pH 5 y aerobiosis a pH 7), y que las condiciones de crecimiento utilizadas modificaban su supervivencia posterior al jugo gástrico simulado. El ajuste del pH del medio de crecimiento a un valor de 7 provocó una disminución notable de la resistencia celular al jugo gástrico, mientras que el ajuste a pH 5 la incrementaba. Por otro lado, las células más resistentes al jugo gástrico no mostraron una mayor resistencia a las sales biliares y viceversa. Estos resultados dificultan el poder escoger unas condiciones de crecimiento óptimas para favorecer la supervivencia de *L. plantarum* durante el tránsito gastrointestinal.

Las dos cepas estudiadas mostraron capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Este efecto inhibitorio era debido principalmente a la capacidad de disminución del pH de *L. plantarum*, probablemente a través de la producción de ácidos orgánicos.

Por último se estudió la capacidad de utilización de azúcares, encontrándose diferencias entre las dos cepas objeto de estudio.

ÍNDICE GENERAL

Índice general	III
Índice de figuras	IV
Índice de tablas	VI
1 Introducción	1
1.1. Bacterias ácido lácticas y fermentación láctica	1
1.2. Utilización en la industria alimentaria	4
1.3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	8
2 Justificación y Objetivos	11
3 Material y Métodos	13
3.1. Medios de cultivo y de tratamiento	13
3.2. Microorganismos, suspensiones y curvas de crecimiento . . .	13
3.3. Determinación de resistencia	17
3.4. Estudio de la capacidad antimicrobiana	19
3.5. Utilización de distintas fuentes de carbono	21
4 Resultados y Discusión	23
4.1. Estudio de las condiciones de crecimiento	23
4.2. Estimación de la resistencia al tránsito gastrointestinal . . .	28
4.3. Componentes antimicrobianos	34
4.4. Utilización de diferentes fuentes de carbono	37
5 Conclusiones	41
Bibliografía	43

ÍNDICE DE FIGURAS

1.1.	Árbol filogenético de las bacterias lácticas y otras Gram +	1
1.2.	Rutas metabólicas en bacterias lácticas	3
3.1.	Metodología utilizada para la obtención de las suspensiones en fase estacionaria.	15
3.2.	Ecuación de Gompertz	16
3.3.	Metodología empleada para la determinación de la resistencia al jugo gástrico y sales biliares.	18
3.4.	Ensayo antimicrobiano. A. <i>Listeria monocytogenes</i> , B. <i>Salmonella</i> Typhimurium	19
3.5.	Ensayo antimicrobiano. C. <i>Escherichia coli</i> , D. <i>Staphylococcus aureus</i>	20
4.1.	Curvas de crecimiento en anaerobiosis y aerobiosis.	23
4.2.	Colonias en medio sólido en aerobiosis y anaerobiosis.	24
4.3.	Variación del pH durante el crecimiento de <i>L.plantarum</i>	25
4.4.	Crecimiento de <i>L.plantarum</i> a pH constante.	26
4.5.	Curvas de crecimiento de las dos cepas de <i>L.plantarum</i> estudiadas.	27
4.6.	Gráficas de supervivencia frente al jugo gástrico simulado	29
4.7.	Gráficas de supervivencia al jugo gástrico simulado	30
4.8.	Fracción de supervivientes frente a sales biliares tras 0 y 2 horas de exposición a diferentes concentraciones	32
4.9.	Fracción de supervivientes tras 1 hora de exposición frente a las sales biliares a concentración 0.5%	33
4.10.	Ensayo antimicrobiano con <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Salmonella</i> Typhimurium	35
4.11.	Ensayo antimicrobiano con <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	36

4.12. Curvas de crecimiento de <i>L.plantarum</i> en presencia de diferentes azúcares.	38
4.13. pH y recuento de microorganismos alcanzado tras 24 horas de incubación con diferentes hidratos de carbono	39

ÍNDICE DE TABLAS

3.1. Cepas utilizadas y sus características más relevantes	14
3.2. Diseño del ensayo antimicrobiano por espectrofotometría.	21
3.3. Componentes de caldo MRS sin azúcares.	21
3.4. Azúcares utilizados en el ensayo por espectrofotometría	22
4.1. Parámetros obtenidos para la modelización de las curvas de crecimiento	27

— CAPÍTULO 1—
INTRODUCCIÓN

1.1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS Y FERMENTACIÓN LÁCTICA

1.1.1. CARACTERÍSTICAS

Las bacterias ácido lácticas engloban un grupo heterogéneo de microorganismos que tienen en común una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. De acuerdo a la taxonomía, el grupo de las bacterias lácticas comprende doce géneros, todos de la división *Firmicutes*, orden *Lactobacillales*. Las bacterias ácido lácticas pueden ser agrupadas en un solo grupo filogenético, junto a otras bacterias gram positivas con bajo porcentaje de G+C (guanina y citosina).

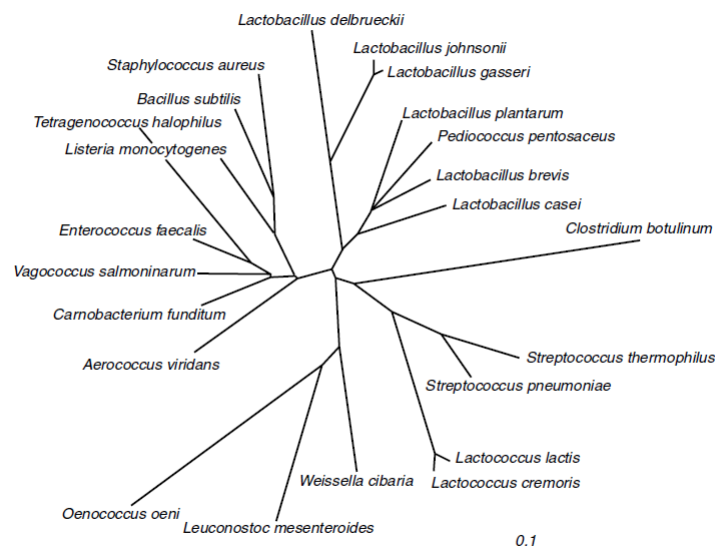


Figura 1.1: Árbol filogenético de las bacterias lácticas y otras Gram +

Generalmente se las describe como bacterias Gram +, con forma de cocos o bacilos, no forman esporos, son inmóviles, catalasa negativas, ácido tolerantes y aero-anaerobias facultativas. Sin embargo, la propiedad más relevante de las bacterias lácticas está relacionada con su metabolismo nutricional, tienen la capacidad de metabolizar los carbohidratos y generar ácido láctico como producto final de la fermentación.

Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, normalmente en ambientes muy nutritivos, ricos en azúcares y proteínas, tales como ciertos productos alimenticios (carne, leche, vegetales) o como integrantes en la flora normal del tracto gastrointestinal, membranas y mucosas de mamíferos.

De los géneros de bacterias lácticas que se aprecian en la Figura 1.1 siete van a ser relevantes en tecnología alimentaria: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* y *Lactobacillus*.

1.1.2. METABOLISMO

Las bacterias lácticas son de metabolismo esencialmente fermentativo; degradan las hexosas utilizando distintas vías enzimáticas:

- Vía de Embden-Meyerhoff: usada por bacterias homofermentativas. En la que convierte un mol de hexosa en dos moléculas de ácido láctico. Esta vía depende de dos enzimas clave; la aldolasa, que divide la fructosa 1-6 difosfato en dos triosas que servirán de sustratos para la producción posterior de ATP y la enzima lactato deshidrogenasa que reduce el piruvato a D- o L- lactato. (Figura 1.2)

En determinadas condiciones medioambientales (limitación o exceso de fuente de carbono o hidratos de carbono poco utilizables) se produce la llamada fermentación ácido mixta con producción final de ácidos láctico, acético, fórmico, CO₂ y etanol (Fordice A.M *et al.*, 1984)

- Vía 6- FosfoGluconato: usada por bacterias heterofermentativas. En esta vía la aldolasa está sustituida por otro enzima, la fosfocetolasa,

1.1. Bacterias ácido lácticas y fermentación láctica

originando cantidades equimolares de ácido acético o etanol y ácido láctico. (Figura 1.2)

Además las bacterias lácticas forman otros componentes orgánicos durante la fermentación que posteriormente intervienen en el sabor de los productos fermentados como pueden ser diacetilo o acetoína.

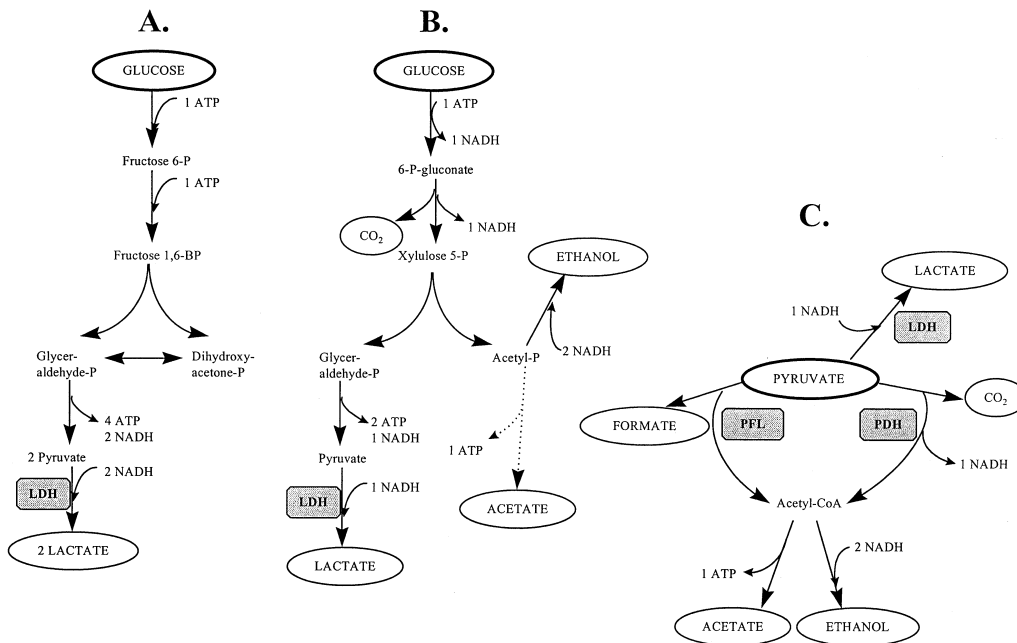


Figura 1.2: Rutas metabólicas en bacterias lácticas. A. Homofermentación, B. Heterofermentación, C. Fermentación mixta. (Hofvendahl, *et al.*2003)

1.2. UTILIZACIÓN EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

1.2.1. APTITUD TECNOLÓGICA

1.2.1.1. FERMENTACIÓN

Son muchos los productos alimenticios cuya fabricación y características se fundamentan en las actividades fermentadoras de los microorganismos. Además de aumentar su vida útil, estos productos poseen un aroma y un sabor proveniente, de forma indirecta o directa, de los microorganismos de la fermentación.

Los alimentos fermentados estaban muy probablemente entre los primeros menús consumidos por el ser humano aunque no intencionadamente. Los productos fermentados eran el inevitable resultado de la comida mal preservada frente a los microorganismos. Así por ejemplo, el zumo de uva u otras frutas se mantenía dulce solo durante unos pocos días hasta que se transformaba en una “placentera” bebida. Poco después, se observó como la mayoría de estos productos eran menos perecederos y más seguros que los mismos crudos. Hacia el año 3000-4000 a.C. los egipcios producían cerveza y pan. Existen pruebas de la elaboración de productos lácteos en culturas que existieron hace 4500 años. Los primeros yogures fueron probablemente de fermentación espontánea, quizá por la acción de alguna bacteria del interior de las bolsas de piel de cabra usadas como recipientes de transporte. Además, podemos encontrar mucha información sobre la producción de vino y otros productos fermentados en la zona mediterránea. Pero fue durante el imperio romano, cuando los nuevos materiales y tecnologías se expandieron por las tierras conquistadas. Durante la edad media, la fabricación de pan, queso o cerveza se convirtió en un oficio de artesanos y desde entonces hasta nuestros tiempos, los productos fermentados se han encontrado entre los alimentos más importantes consumidos por el ser humano.

La fermentación a nivel industrial hoy en día no tiene nada que ver con

el pasado. En muchos casos se llevan a cabo en biorreactores a partir de cultivos iniciadores. Los cultivos iniciadores o estárter son preparaciones de cultivos, de cepas de microorganismos seleccionados por su fuerte actividad enzimática, que agregados en proporción definida, producen la transformación deseada del sustrato.

Estos microorganismos se encuentran liofilizados o congelados, se pueden agregar directamente al producto, aunque en ocasiones pasan por una etapa intermedia, se añaden al tanque de inóculo que puede tener un volumen de 50, 500 o 1000 litros según la escala industrial posterior. Del tanque de inóculo se pasa posteriormente al fermentador industrial cuyo volumen, que varía de acuerdo al producto a obtener y a su concentración, está comprendido comúnmente entre 10,000 y 100,000 litros.

La industria alimentaria utiliza sistemas de fermentación con distinto grado de estandarización dependiendo del producto. Así, por ejemplo, en los procesos de fabricación de yogur se utilizan cepas muy específicas, habitualmente proporcionadas por una industria especializada en la obtención de dichos cultivos en forma de congelado o liofilizado. Los tiempos y temperaturas de fermentación están preestablecidos y el producto final obtenido presenta unas características homogéneas en diferentes lotes de fabricación.

Por el contrario, los productos vegetales fermentados se obtienen frecuentemente con microorganismos propios de la flora natural presente en la superficie, por lo que generalmente existe una mayor diversidad de microorganismos participantes. No es habitual el uso de cultivos iniciadores industriales, los tiempos y temperaturas de fermentación varían, y las características del producto final pueden ser muy diferentes.

1.2.1.2. APTITUD PROBIÓTICA

El uso de bacterias lácticas no responde únicamente a la necesidad de fermentar materias primas para la obtención de alimentos con características propias. En los últimos años existe una demanda creciente por parte de la sociedad de alimentos que contengan bacterias probióticas, así como de

bacterias probióticas administradas como suplemento alimenticio. Las bacterias probióticas, según la OMS, son microorganismos vivos, que siendo administrados en cantidades adecuadas confieren un beneficio en la salud del huésped. La microbiota intestinal comprende aproximadamente el 95% de las bacterias totales en el cuerpo humano. Alrededor de 10^9 - 10^{10} UFC por gramo de contenido intestinal. Es posible clasificar los componentes de la microbiota según los efectos que producen en la salud del huésped (Gibson et al., 2003):

- Bacteria con efectos patogénicos
- Bacteria que presenta actividades patógenas y beneficiosas
- Bacteria con efectos estrictamente beneficiosos

Los géneros bacterianos más importantes, pertenecientes a este último grupo y considerados con propiedades probióticas son *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Estos han sido tradicionalmente escogidos como microorganismos beneficiosos, debido a que promueven efectos saludables en sus nichos naturales. De acuerdo a Salminen et al. (2004), se ha demostrado con ensayos en humanos que las bacterias probióticas ejercen un efecto probado en el control de las diarreas causadas por rotavirus y por consumo de antibióticos, disminuyen los síntomas de la intolerancia a la lactosa, y también alivian síntomas de alergias alimentarias en niños. Además, mediante estudios aún por confirmar en humanos se ha sugerido que podrían también prevenir algunas enfermedades como el cáncer de colon y vejiga, las diarreas por *Clostridium difficile*, la enfermedad de Crohn, y ayudar a controlar el colesterol sérico, entre otros efectos. A ello hay que sumarle sus efectos nutricionales como la producción de vitaminas del grupo B y K o ácidos grasos de cadena corta.

Para que un microorganismo probiótico pueda ejercer su acción beneficiosa en el hospedador es necesario que permanezca viable en suficiente número hasta el momento de su ingestión, y que sea capaz de atravesar las barreras gastrointestinales para alcanzar el intestino y colonizarlo. Por lo

tanto, su selección se realiza de acuerdo a criterios de actividad probiótica, como por ejemplo actividad antimicrobiana frente a patógenos, pero también de acuerdo a criterios relacionados con su capacidad de crecimiento y de supervivencia frente a condiciones medioambientales adversas, es decir, criterios de viabilidad.

Los factores más importantes a tener en cuenta en la viabilidad de probióticos son:

- Las variables que se dan durante el crecimiento de la célula como el pH del medio, el tipo y la concentración de carbohidratos, las fases del crecimiento y la situación fisiológica de las células en el momento de su recolección. A este respecto es importante destacar que existe muy poca información disponible en la literatura científica. En general los cultivos se obtienen a la temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo, y es práctica habitual neutralizar el medio de crecimiento para evitar el efecto inhibitorio y conseguir así mayores concentraciones microbianas. Se ha observado además que la presencia de oxígeno en el medio puede provocar efectos tóxicos en algunas cepas de *Lactococcus*, y favorecer la producción de peróxido de hidrógeno, que podría ejercer un efecto autoinhibitorio (Mäyrä-Mäkinen, Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria).
- Las barreras biológicas a las que se enfrentan las bacterias en el organismo, tales como jugos gástricos y sales biliares.
- Las resistencias frente a procesos tecnológicos en la producción de alimentos.

La importancia de todos estos factores dependerá en gran medida del modo en el cual se administre el probiótico. Así, existen microorganismos probióticos, como los pertenecientes al género *Bifidobacterium*, que son muy exigentes en cuanto a sus condiciones de crecimiento. Estos microorganismos, en general, se añaden a los alimentos una vez finalizado el proceso

de fabricación. Por el contrario, existen microorganismos probióticos que además son capaces de fermentar las materias primas alcanzando concentraciones elevadas al final del proceso productivo, son los denominados estárter probióticos. Por último, numerosas cepas probióticas son administradas en forma de preparado alimenticio.

1.3. *Lactobacillus plantarum*

1.3.1. CARACTERÍSTICAS

El género *Lactobacillus*, al que se refiere este trabajo, es el grupo más amplio formado por más de 80 especies y se caracteriza por su alta heterogeneidad. En concreto la especie estudiada *Lactobacillus plantarum* se caracteriza por presentar células en forma de bacilos largos y extendidos cuya longitud y curvatura depende de la edad del cultivo, la composición del medio y la tensión de oxígeno. Las colonias de *Lactobacillus plantarum* en medios sólidos son pequeñas (2-5 μ m), convexas, opacas y sin pigmentos.

Lactobacillus plantarum es una bacteria láctica heterofermentativa facultativa, metabólicamente muy flexible y versátil que se encuentra en un gran rango de ambientes, incluyendo los productos lácteos y cárnicos fermentados o el tracto gastrointestinal humano (Kleerebezem et al. 2003). Sin embargo, su nicho más habitual son los alimentos fermentados de origen vegetal.

Lactobacillus plantarum difiere del resto de especies *Lactobacillus* en los siguientes aspectos:

1. Posee un genoma relativamente grande con numerosos genes que codifican su capacidad de adaptación a diversas condiciones (Kleerebezem et al. 2003).
2. Puede fermentar gran cantidad de carbohidratos.
3. Requiere una alta concentración de manganeso para su crecimiento, y lo acumula de manera intracelular. El manganeso provee a *Lactobaci-*

llus plantarum de una defensa frente al estres oxidativo. (Archibald y Fridovich 1981).

4. Tiene una alta tolerancia al pH bajo lo que implica que frecuentemente predomine en fermentaciones ácido lácticas espontáneas e incluso, sea capaz de sobrevivir a través del tracto gastrointestinal humano (Johanson *et al.*, 1993).

Es ampliamente utilizada como stárter en productos vegetales o animales (Salovaara *et al.*, 2004), como probiótico para humanos debido a sus actividades de mejora de la salud (Goossens *et al.*, 2005) y últimamente como un vehículo para la producción de compuestos terapéuticos (Mercerier *et al.*, 2003).

1.3.2. *L. plantarum* 299v

L.plantarum 299v es una de las cepas probióticas de *Lactobacillus* más estudiadas. Esta cepa ha sido aislada del intestino humano, lo que explica su amplio poder beneficioso en el tracto gastrointestinal. Tiene excelentes características de adhesión mediante la unión de manosa en células de la mucosa, coloniza el tracto intestinal e impide por tanto que otras bacterias se adhieran, Además, *L.plantarum* 299v ha demostrado estimular la producción de mucina en las células, evitando la colonización por patógenos. Se utiliza además como microorganismo modelo para la producción de bacteriocinas (Gyu-Sung *et al.*, 2010).

Algunas de las propiedades demostradas de *L. plantarum* 299v son:

- Se adhiere a las células del colon formando una barrera defensiva.
- Disminuye de distensión abdominal en pacientes con síndrome de intestino irritable.
- Mejora el estado de la mucosa por disminución de bacterias gram negativas.

- Reduce la inflamación de la mucosa intestinal.
- Incrementa la concentración de ácidos carboxílicos en heces.
- Disminuye la concentración de fibrinógeno en la sangre (evitando la coagulación).

Actualmente se comercializa en España bajo el nombre de Protransitus (Laboratorios Salvat), presentado en cápsulas digeribles, e indicado para pacientes con síndrome de intestino irritable.

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La tendencia actual al desarrollo de nuevos alimentos fermentados a partir de materias primas diferentes y preferiblemente con efectos beneficiosos para la salud del consumidor está impulsando un fuerte esfuerzo investigador para aislar, caracterizar y optimizar la utilización de cepas de bacterias ácido lácticas con propiedades adecuadas.

Lactobacillus plantarum se está mostrando como una especie de gran interés dada su capacidad de ejercer de cultivo iniciador, es decir, es capaz de fermentar las materias primas con eficacia, incluyendo matrices de origen vegetal, y además, muchas cepas presentan probada capacidad probiótica.

El objetivo general de este trabajo fue estudiar la influencia de las condiciones de crecimiento de *L.plantarum* en algunas características de interés para su posterior utilización como microorganismo probiótico. Asimismo se estudió la capacidad de fermentación de diversos azúcares, de interés tanto tecnológico como probiótico.

Se plantearon los siguientes objetivos parciales:

- Estudiar la influencia de las condiciones de cultivo (presencia y ausencia de oxígeno, pH) en la tasa de crecimiento y densidad máxima celular alcanzada por *L. plantarum* 299v y CECT 748.
- Estudiar y comparar la supervivencia de las dos cepas en un sistema modelo de jugo gástrico y sales biliares.
- Establecer si las condiciones de obtención del cultivo (presencia y ausencia de oxígeno, pH) influyen sobre la supervivencia de *L.plantarum* al jugo gástrico y a las sales biliares.
- Estudiar la capacidad antimicrobiana frente a diversos microorganismos.

mos patógenos de interés en alimentos (*L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *S. aureus* y *E. coli*).

- Analizar la capacidad de fermentación de diferentes carbohidratos y determinar si existen diferencias intraespecíficas.

Para ello se escogieron dos cepas que *a priori* podían presentar diferente comportamiento: *L.plantarum* 299v y *L.plantarum* CECT 748. La primera de ellas es una cepa aislada del intestino humano y considerada con capacidad probiótica, que se utiliza como suplemento farmacéutico en individuos con alteraciones en la función intestinal. La segunda es la cepa tipo de la colección americana, la ATCC 14917, cuyo origen es col fermentada.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MEDIOS DE CULTIVO Y DE TRATAMIENTO

El agar y el caldo de cultivo Man, Rogosa, Sharpe (MRS) así como el agar tripticasa-soja (TSA) y el caldo triticasa-soja (TSB) fueron administrados por la firma Biolife (Milán, Italia), y se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los medios TSB y TSA fueron suplementados con 0,6 % de extracto de levadura (EL, Biolife).

Para llevar a cabo las diluciones decimales se utilizó como diluyente Maximum Recovered Diluent (MRD) (Oxoid).

Todos los medios, una vez preparados, se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121 °C y se almacenaron hasta su posterior uso.

3.2. MICROORGANISMOS, SUSPENSIONES Y CURVAS DE CRECIMIENTO

3.2.1. MICROORGANISMOS

Para este estudio se utilizaron las cepas microbianas presentes en la Tabla 3.1. Todas las cepas se conservaron en crioviales (Scharlau, Barcelona, España) a -80 °C.

3.2.2. SUSPENSIONES DE TRABAJO

Las suspensiones de *L. plantarum* se prepararon a partir del criovial en congelación. Se sembraron placas de agar MRS por agotamiento y se

3.2. Microorganismos, suspensiones y curvas de crecimiento

Microorganismos	Características
<i>Lactobacillus plantarum</i> 299v	Procedente del intestino humano y aislada del preparado comercial Protransitus LP (Laboratorios Salvat, SA, Barcelona).
<i>Lactobacillus plantarum</i> CECT 748	Fermentación vegetales. Aislada a partir de col.
<i>Listeria monocytogenes</i> CECT 4032	Serotipo 4b
<i>Staphylococcus aureus</i> CECT 4459	Productora enterotoxina tipo B
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	No productora de enterotoxina
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium CECT 878	

Tabla 3.1: Cepas utilizadas y sus características más relevantes

incubaron durante 24 horas a 37°C en la cámara de anaerobiosis MACS VA500 (Don Whitley Scientific Limited, Shipley, Reino Unido). A partir de una colonia aislada se sembraron frascos que contenían 10 ml de caldo MRS estéril, se incubaron durante 12-16 horas a 37°C en agitación y de nuevo en condiciones anaeróbicas. Tras ese tiempo se inocularon 50 μ l del precultivo en frascos de 50 ml de caldo MRS estéril obteniéndose una concentración inicial de aproximadamente 10^6 UFC/ml. Posteriormente los frascos se incubaron en la cámara de anaerobiosis o, en caso de condiciones aerobias, en estufas de aire forzado (modelo HOTCOLD UL, Selecta). En ambos casos en agitación continua y a 37°C hasta alcanzar la fase de crecimiento deseada.

El tiempo de incubación necesario para la obtención de suspensiones en fase estacionaria de crecimiento se determinó a partir de las curvas de crecimiento.

En el caso de los microorganismos patógenos reseñados en la tabla 3.1, se siguió el mismo procedimiento pero utilizando caldo TSB-EL y agar TSA-EL como medios de cultivo, en condiciones de crecimiento a 37°C y aerobiosis.

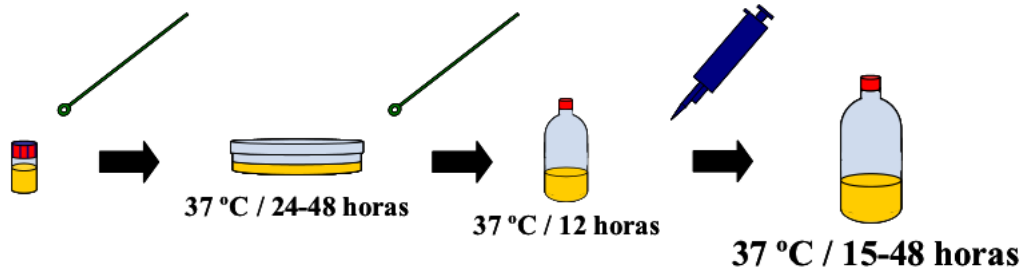


Figura 3.1: Metodología utilizada para la obtención de las suspensiones en fase estacionaria.

3.2.3. OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES A DIFERENTES CONDICIONES DE PH

Para estudiar la influencia del pH en el crecimiento y la resistencia celular se inocularon 100 μ l de precultivo en frascos Erlenmeyer con 100 ml de caldo MRS en el cual se sumergió un electrodo de pH conectado a un titrador automático (Modelo pH Burette 24, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España). Este equipo permite la medida continua del pH y su mantenimiento a un valor constante preestablecido mediante la adición de volúmenes adecuados de una solución de ácido o de álcali. Además, el equipo dispone de un interface de conexión a un ordenador, para la adquisición y registro de los valores de pH y los volúmenes de reactivos añadidos a lo largo del tiempo de incubación.

En esta investigación se obtuvieron suspensiones de *L. plantarum* en condiciones de pH constante de 5.0 y 7.0, utilizando como reactivos HCl 1N para acidificar el medio, y NaOH 1N para alcalinizarlo. Estos cultivos se obtuvieron siempre en condiciones de aerobiosis y se utilizó un sistema de agitación magnética para garantizar la homogeneidad.

3.2.4. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para la elaboración de las curvas de crecimiento, se extrajeron 0.1 ml de muestra tras periodos de tiempo predeterminados. Se realizaron las correspondientes diluciones decimales y se sembraron en superficie en placas de agar MRS que se incubaron en cámara de anaerobiosis a 37 °C durante 24 horas. El recuento se realizó de forma manual, y las curvas de crecimiento se elaboraron representando el logaritmo del número de UFC/ml frente al tiempo de incubación. Las curvas se obtuvieron al menos por duplicado para cada condición experimental (anaerobiosis pH sin controlar, aerobiosis pH sin controlar, aerobiosis pH 5,0 y aerobiosis pH 7,0) y para cada cepa (*L. plantarum* 299v y *L. plantarum* CECT 748).

Las curvas de crecimiento se modelizaron utilizando el modelo de Gompertz (Gibson *et al.*, 1988) para lo que se utilizó el programa Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Co., Redmond, Washington, EE. UU.) y la herramienta Solver. Dicho modelo viene definido por la siguiente ecuación:

$$\text{Log } N_t = N_0 + C e^{\{-e^{[-B(t-M)]}\}}$$

Figura 3.2: Ecuación de Gompertz

La ecuación de Gompertz es uno de los modelos primarios más ampliamente utilizados para describir el crecimiento bacteriano. Representa un modelo de regresión no lineal. Su forma sigmoideal está representada por los siguientes parámetros:

- N_t ; número de microorganismos a tiempo t (UFC/ml)
- N_0 : logaritmo decimal del número inicial de microorganismos (log UFC/ml)
- C : logaritmo del recuento en la fase estacionaria
- M Tiempo al cual el cultivo alcanza su máxima velocidad de crecimiento (horas)

- B: velocidad de crecimiento relativo en el punto M (horas -1)

3.3. DETERMINACIÓN DE RESISTENCIA

3.3.1. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL JUGO GÁSTRICO SIMULADO

Para determinar la resistencia al jugo gástrico se utilizó el sistema modelo descrito por Vinderola *et al.* (2003). Como medio de tratamiento se utilizó tampón fosfato sódico 0.1M, (según Dawson R.M.C., 1974) que se esterilizó en el autoclave y se almacenó hasta su uso. Posteriormente se le añadió un 0.3% de pepsina (Sigma), 0.1% de NaCl y se acidificó con HCl hasta los valores deseados de pH (1.5, 2.0 y 2.5). Para ello se utilizó un pHmetro (modelo Basic 20, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España) al que se conectó un electrodo de pH (modelo 52 03, Crison Instruments S.A., Alella, Barcelona, España).

Posteriormente se procedió a la esterilización por filtración con un filtro de 0.2 μm . Una vez filtrado se inocularon los microorganismos a una concentración inicial de aproximadamente 10^7 UFC/ ml, en un volumen de trabajo de 10 mL. Se extrajeron muestras de 0.1 ml a intervalos de tiempo predefinidos neutralizándolas con tampón fosfato no acidificado, y tras las diluciones correspondientes se sembraron en superficie en placas de MRS para su posterior incubación.

3.3.2. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A SALES BILIARES

Como medio de tratamiento se utilizó el tampón fosfato previamente esterilizado como se comenta en la determinación anterior. En este caso, se prepararon 10 ml de tampón fosfato, no acidificado (pH 7.0), en tubos estériles y se les añadió una cantidad determinada de Sales Biliares (Biolife, Milán,

Italia) obteniendo unas concentraciones finales de 0, 0.15, 0.30, 0.50, 1, 2 y 5 %. El resto del procedimiento fue análogo al descrito para la determinación de la resistencia a jugo gástrico simulado.

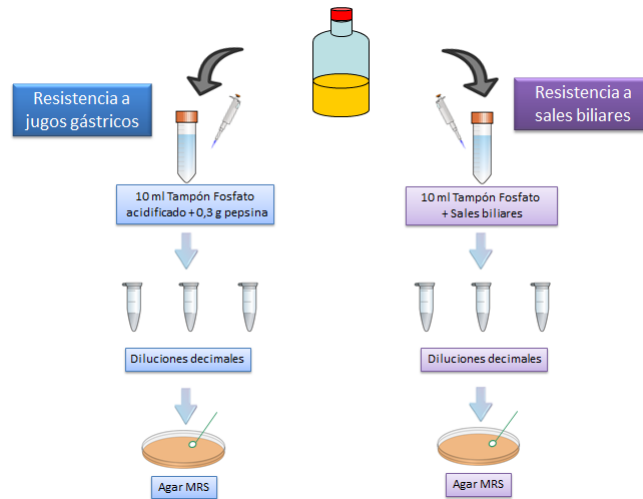


Figura 3.3: Metodología empleada para la determinación de la resistencia al jugo gástrico y sales biliares.

3.3.3. INCUBACIÓN Y RECuento DE SUPERVIVIENTES

El recuento de supervivientes se realizó en agar MRS mediante la técnica de extensión en superficie. Las placas se incubaban a 37 °C en la cámara de anaerobiosis durante 24-48 horas hasta que el número de colonias se mantenía constante.

El recuento de supervivientes se realizó por conteo manual o con la ayuda del contador automático de colonias mediante análisis de imagen. A partir de estos recuentos se obtuvieron las correspondientes gráficas de supervivencia representando el logaritmo de la fracción de supervivientes frente al tiempo de tratamiento. Cada gráfica se obtuvo al menos por duplicado en diferentes días de trabajo. Las diferencias entre la fracción de supervivientes se analizaron mediante el test estadístico de t de Student utilizando el programa informático Graphpad Prism.

3.4. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIMICROBIANA

Se estudió la capacidad de inhibición de las dos cepas de *Lactobacillus plantarum* sobre cuatro microorganismos patógenos de interés: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* O157:H7.

Para ello, en una primera etapa se exploró la existencia de inhibición del crecimiento mediante la técnica de spot-on the lawn, utilizando una estría de *L. plantarum* en lugar de crecimiento en forma de botón. Se prepararon placas de MRS sobre las cuáles se sembraron las dos cepas de *L. plantarum* en estría, que se incubaron durante 24 horas a 37°C en anaerobiosis. Transcurrido dicho tiempo, y una vez existía crecimiento microbiano abundante en estría, se depositaron 7-10 ml de agar atemperado a 45°C e inoculado con 10^7 ufc/ml del microorganismo patógeno indicador. Una vez solidificada esta segunda capa se procedió a incubar las placas nuevamente, a 37°C y aerobiosis, para permitir el crecimiento de la cepa patógena y observar la presencia de halos de inhibición del crecimiento como se muestra en la figura 3.4 y 3.5.

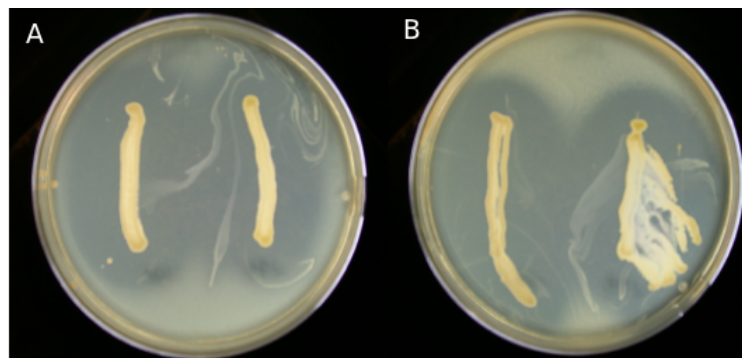


Figura 3.4: Ensayo antimicrobiano. A. *Listeria monocytogenes*, B. *Salmonella* Typhimurium

Una vez evidenciada la presencia de inhibición del crecimiento, se procedió a desarrollar una metodología que permitiera cuantificar el grado de

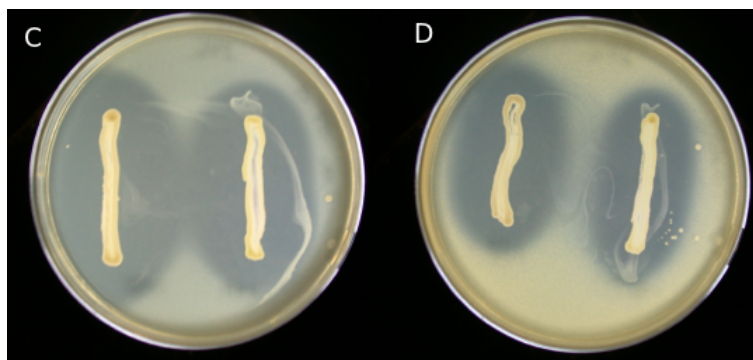


Figura 3.5: Ensayo antimicrobiano. *C.Escherichia coli*, *D.Staphylococcus aureus*

inhibición del crecimiento mediante espectrofotometría. Para ello, a partir de cultivos de *L. plantarum*, se obtuvieron los sobrenadantes libres de células mediante centrifugación (10.000 rpm/5 min) y filtración del sobrenadante a través de un filtro de 0,22 μm .

La capacidad inhibitoria del sobrenadante libre de células se evaluó mediante el seguimiento de la evolución de la absorbancia a 595 nm de un cultivo del microorganismo patógeno ensayado en presencia y ausencia de sobrenadante de *L. plantarum*. Además, con objeto de investigar en la naturaleza del efecto antimicrobiano observado las muestras de sobrenadante a ensayar se procesaron según se describe a continuación (Essid *et al.*, 2009; Zago *et al.*, 2011).

- SN1: sobrenadante libre de células (pH 3.8)
- SN2: sobrenadante libre de células y pH ajustado a 6.5 con NaOH.
- SN3: muestra SN2, sometida a un tratamiento con 300 UI/ml de catalasa (Sigma) a 37°C durante 2h, seguido de una incubación a 65°C durante 30 min para inactivar la catalasa residual.
- SN4: muestra SN2 sometida a una digestión con 1 mg/mL de tripsina (37°C/1hora; 65°C/30 min).

3.5. Utilización de distintas fuentes de carbono

Se utilizaron para ello placas microtiter, con volúmenes de ensayo de 200 μ l por pocillo según se indica en la siguiente tabla:

	Caldo TSB estéril	Caldo MRS estéril	Sobrenadante de <i>L.plantarum</i> (SN1,SN2,SN3,SN4)	Suspensión celular de patógenos
Control -	150 μ l	50 μ l	0 μ l	0 μ l
Control +	145 μ l	50 μ l	0 μ l	5 μ l
Muestras	145 μ l	0 μ l	50 μ l	5 μ l

Tabla 3.2: Diseño del ensayo antimicrobiano por espectofotometría.

3.5. UTILIZACIÓN DE DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

Para el estudio de la utilización de diferentes azúcares se realizó un medio líquido MRS con sus componentes habituales eliminando la glucosa. La tabla 3.2 muestra los componentes de la mezcla.

Componente	Cantidad
Peptona	10 g/l
Yeast Extract	5 g/l
Beef Extract	10 g/l
K ₂ HPO ₄	2 g/l
Sodium Acetate	5 g/l
Ammonium Citrate	2 g/l
MgSO ₄	0.2 g/l
MnSO ₄	0.05 g/l
Tween 80	1 ml

Tabla 3.3: Componentes de caldo MRS sin azúcares.

Se prepararon frascos de 50 ml de MRS sin azúcares a los que se les añadió 1 g de los hidratos de carbono citados en la figura 3.3. Posteriormente

fueron autoclavados durante 20 minutos a 121 °C.

Una vez los medios fueron preparados se les añadió 50 μl de suspensión bacteriana (aproximadamente 10^6 microorganismos/ml). Los frascos se incubaron en aerobiosis a 37°C y en agitación continua, y fueron utilizados para realizar medidas de pH y de recuento microbiano tras 24 y/o 48h de incubación. Paralelamente, se inocularon 250 μl de cada frasco en 4-8 pocillos de placas microtiter, incubada en las mismas condiciones (Figura 3.6). A partir de estas placas se realizaron medidas de absorbancia de cada pocillo a lo largo del tiempo de incubación, a 595 nm, en un espectrofotómetro modelo Tecan Genios (Tecan Ltd., Seestrasse, Suiza).

Azúcares utilizados
Sin azúcares
Glucosa
Maltosa
Dextrina
Sacarosa
Rafinosa
Inulina
Fructosa
Lactosa
Almidón

Tabla 3.4: Azúcares utilizados en el ensayo por espectrofotometría

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE CRECIMIENTO

4.1.1. ANAEROBIOSIS Y AEROBIOSIS

Para conocer la influencia del oxígeno en el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*, tanto la cepa 299v como CECT 748 fueron incubadas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis. Las curvas de crecimiento obtenidas aparecen representadas en la Figura 4.1.

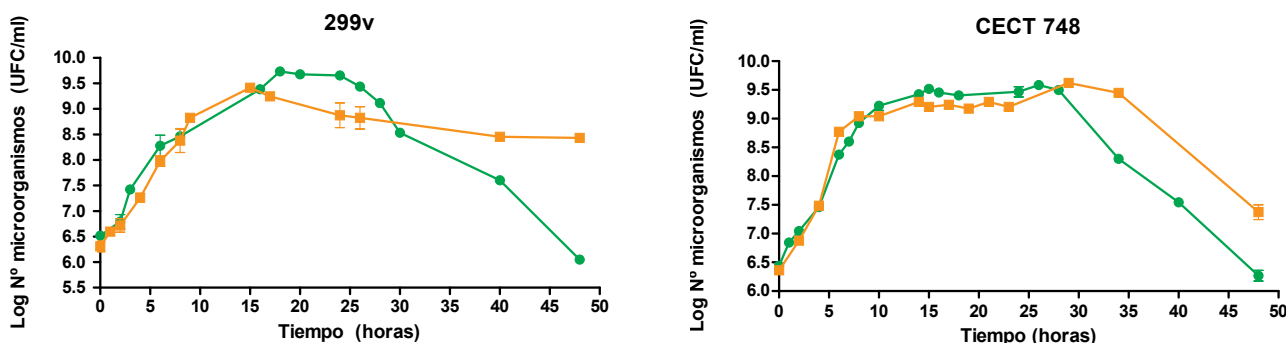


Figura 4.1: Curvas de crecimiento en anaerobiosis (●) y aerobiosis (■).

Como se puede observar, la fase de crecimiento exponencial se prolongó en ambos casos hasta las 10-15 horas, momento en el cual se alcanzó la fase estacionaria. Tras un periodo de tiempo en fase estacionaria, variable según la cepa y las condiciones, el recuento microbiano comenzó a descender. Este descenso se produjo antes y/o de manera más acusada cuando las células se

cultivaron en condiciones en ausencia de oxígeno. La mayoría de las bacterias lácticas suelen desarrollarse mejor en sistemas anaeróbicos, aún cuando, como *Lactobacillus plantarum* son bacterias aero-anaerobias facultativas. Sin embargo, las dos cepas de estudio crecieron de manera muy similar bajo aerobiosis y anaerobiosis. El cultivo en condiciones de anaerobiosis no provocó la obtención de tasa de crecimiento más elevada (ver Tabla 4.1). Por el contrario, el crecimiento en condiciones de aerobiosis fue incluso más ventajoso, ya que, como se aprecia en la Figura 4.1, pasadas 48 horas el recuento en anaerobiosis había disminuído de manera más acusada.

Sin embargo, este efecto no se confirmó en medio sólido MRS, donde el tamaño de las colonias era mucho menor cuando se incubaban en presencia de oxígeno (Figura 4.2), aunque los recuentos microbianos permanecían idénticos.

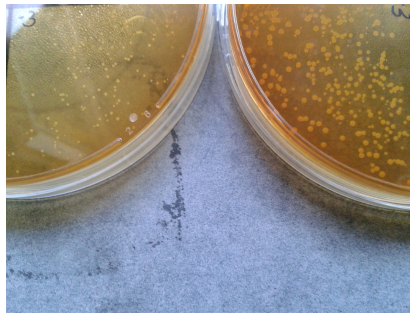


Figura 4.2: Colonias en medio sólido en aerobiosis (izquierda) y anaerobiosis (derecha).

4.1.2. CRECIMIENTO A DISTINTOS PH

Como ya se ha mencionado en la introducción, las bacterias lácticas fermentan los azúcares del medio, produciendo su acidificación. Esta disminución del pH del medio, se cree es responsable de la inhibición del crecimiento y de la entrada en fase estacionaria de los cultivos, en la Figura 4.3, se muestra la variación del pH conforme aumenta el crecimiento microbiano de ambas cepas cultivadas en condiciones de aerobiosis y de anaerobiosis.

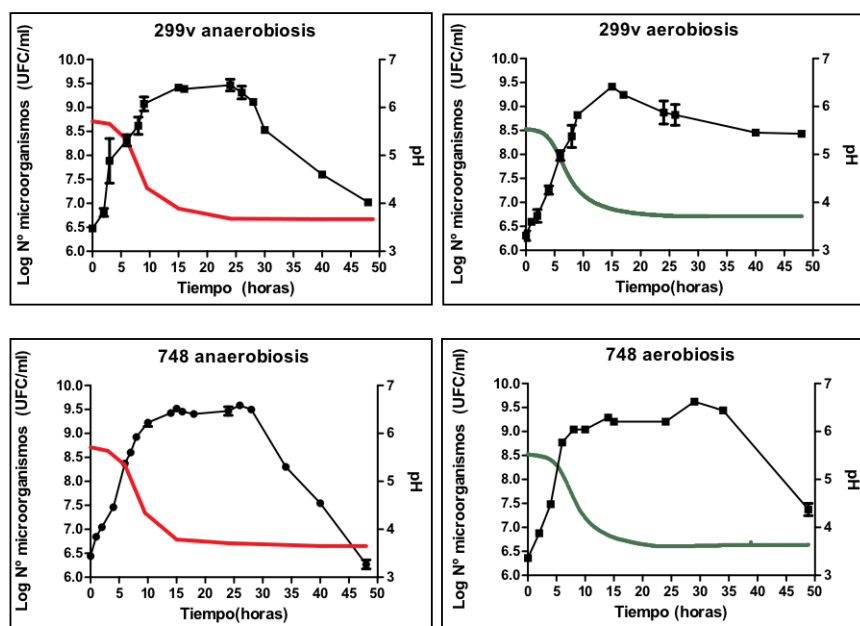


Figura 4.3: Variación del pH durante el crecimiento de *L. plantarum*.

Se observa cómo el inicio de la bajada de pH comenzaba aproximadamente a las 2-3 horas de incubación, cuando el cultivo se encuentra en su fase exponencial y que el pH disminuía progresivamente a valores de aproximadamente 3.6-3.8, en los cuáles se estabilizaba una vez alcanzada la fase estacionaria para las dos cepas estudiadas y las dos condiciones de crecimiento.

Dada la importante acidificación que se produce en el medio de cultivo, la neutralización del mismo es un recurso utilizado en la obtención industrial de cultivos iniciadores para conseguir una mayor densidad celular y con ello una mayor eficacia en el proceso de producción. Con objeto de comprobar este extremo, se obtuvieron las curvas de crecimiento de *L. plantarum* 299v y CECT 748 en condiciones de pH controlado, mediante el uso de un titrador automático. La Figura 4.4 muestra las curvas de crecimiento a dos niveles de pH (pH neutro 7.0 y pH ligeramente ácido 5.0) de las dos cepas objeto de estudio. Estas suspensiones se obtuvieron siempre en condiciones de aerobiosis.

4.1. Estudio de las condiciones de crecimiento

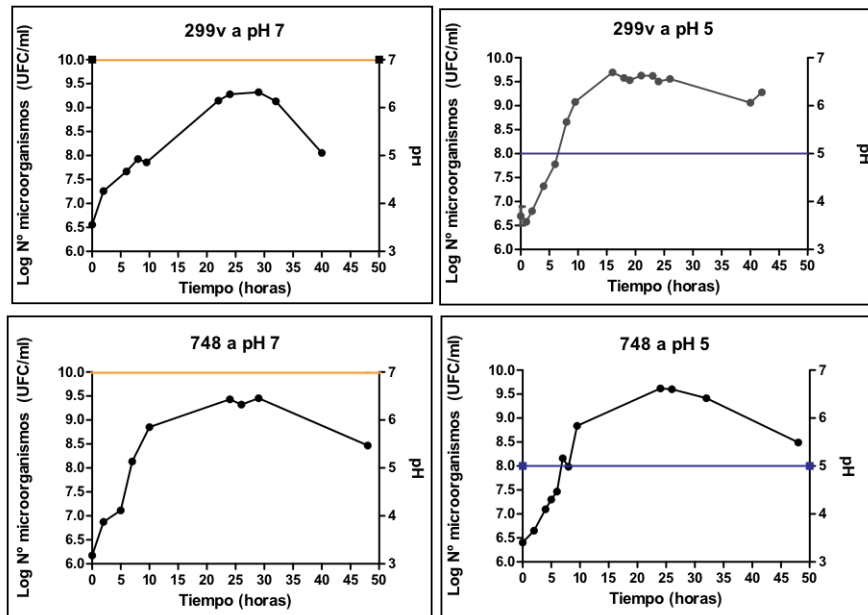


Figura 4.4: Crecimiento de *L. plantarum* a pH constante.

La Figura 4.5 muestra las curvas de crecimiento obtenidas para las dos cepas y las cuatro condiciones estudiadas a efectos comparativos. Es importante resaltar que las curvas correspondientes a las denominación de aerobiosis y anaerobiosis fueron obtenidas en condiciones de ausencia de control de pH (Figura 4.3)

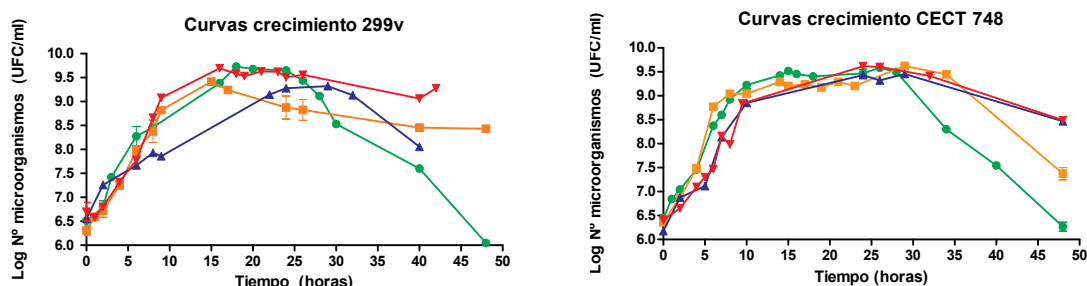


Figura 4.5: Curvas de crecimiento de las dos cepas de *L.plantarum* estudiadas. Anaerobiosis(●), aerobiosis(■), pH 7 constante(▲), pH 5 constante(▼).

Los datos experimentales se ajustaron al modelo de Gompertz que describe la curva de crecimiento microbiana hasta el momento de comienzo del declive. Los coeficientes de determinación (r^2) de todos los ajustes fueron superiores a 0.975.

Los parámetros cinéticos obtenidos se incluyen en la Tabla 4.1.

	No (Log UFC/ml)	C (Log UFC/ml)	B (1/horas)	M (horas)	Recuento máx. (Log UFC/ml)
299v ana	6.099	3.549	0.235	3.421	9.648
299v aero	6.393	2.808	0.353	4.383	9.201
299v pH7	6.695	2.638	0.197	6.306	9.333
299v pH5	6.650	2.997	0.367	5.454	9.647
748 ana	6.323	3.111	0.301	5.204	9.434
748 aero	6.446	2.786	0.548	3.588	9.232
748 pH7	6.319	3.107	0.294	5.204	9.426
748 pH5	6.475	3.153	0.319	5.854	9.628

Tabla 4.1: Parámetros obtenidos para la modelización de las curvas de crecimiento

Al comparar el crecimiento en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis se puede observar que, para las dos cepas estudiadas, se obtuvo una tasa de crecimiento más rápida en aerobiosis (parámetro B), aunque el recuento máximo alcanzado fue inferior.

Respecto al pH, se observa que a pH 5.0 se obtuvieron mayores concentraciones microbianas finales, y que a pH 7.0, las tasas de crecimiento fueron más bajas, sobre todo en la cepa 299v.

Por otro lado, al comparar las etapas finales de la curva de crecimiento, no incluidas en la modelización de Gompertz, se observa que efectivamente el control del pH a un valor de 5.0 retrasaría la fase de declive en los dos microorganismos estudiados.

En la siguiente sección se comprobará cuales de estas condiciones son las más adecuadas para los diferentes estudios de supervivencia.

4.2. ESTIMACIÓN DE LA RESISTENCIA AL TRÁNSITO GASTROINTESTINAL

Una de las principales características de los microorganismos probióticos es la capacidad de atravesar el sistema gastrointestinal para ejercer su función beneficiosa. El jugo gástrico y las sales biliares son las barreras más importantes a las que se ve expuesto un microorganismo probiótico en nuestro organismo. Pese a su importancia, no se conoce con detalle cómo podrían influir los factores fisiológicos celulares en la resistencia microbiana. En esta parte de la investigación se llevó a cabo un estudio para caracterizar y comparar la resistencia a jugo gástrico simulado y a sales biliares de las dos cepas objeto de estudio, y se evaluó la influencia de las condiciones de obtención del cultivo en dicha resistencia.

4.2.1. RESISTENCIA A JUGO GÁSTRICO SIMULADO

4.2.1.1. CARACTERIZACIÓN

El jugo gástrico humano puede mostrar un pH variable, generalmente comprendido entre valores de 1.0 y 3.5, dependiendo de diversos factores

fisiológicos, como son entre otros, la presencia de bolo alimenticio.

Inicialmente se caracterizó la resistencia a distintos valores de pH de las dos cepas cultivadas en condiciones de anaerobiosis (pH 1.5, 2.0 y 2.5), siguiendo la técnica que se cita en la sección 3.3.1. De este modo se escogieron las condiciones de trabajo más adecuadas para el estudio posterior.

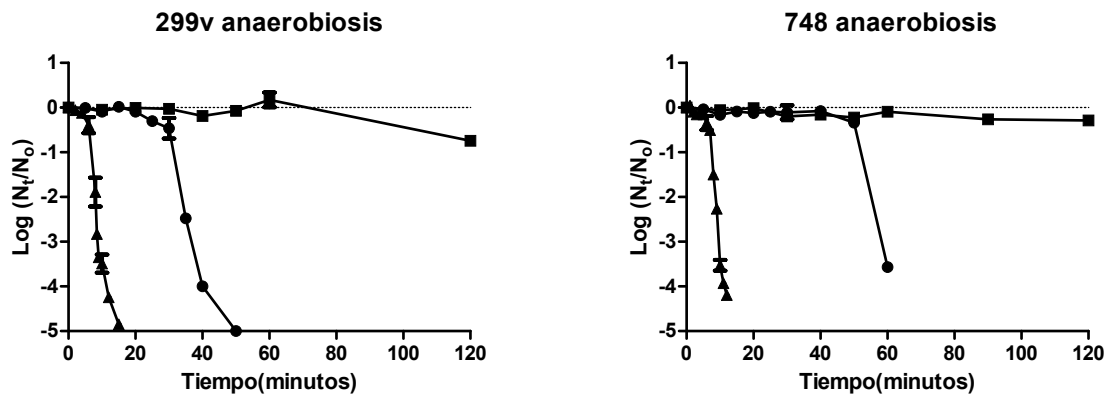


Figura 4.6: Gráficas de supervivencia frente al jugo gástrico simulado a pH 1.5(▲), 2.0(●) y 2.5(■).

La Figura 4.6 muestra las gráficas de supervivencia a los tres valores de pH estudiados en ambas cepas. La velocidad de inactivación fue menor conforme el pH del jugo gástrico simulado aumentaba, de hecho a pH 2.5 pasadas dos horas de tratamiento no existió tan apenas inactivación. Ambas cepas mostraron una cinética de inactivación muy similar, si bien la cepa CECT 748 fue ligeramente más resistente. Esta mayor resistencia se debe a la presencia de un fenómeno de hombro, que fue de mayor duración en la cepa 748 y que también se observó en las gráficas de supervivencia realizadas a pH 1.5. La presencia de fenómenos de hombro en las gráficas de supervivencia frente a los agentes químicos es un hecho frecuente (Cebrián *et al.*, 2008), y se atribuye a la necesidad de que se produzca un número elevado de daños subletales en las células antes de que comience la inactivación celular. También se ha propuesto que el hombro podría ser el reflejo de un retraso

en el comienzo de la inactivación celular debido a la necesidad por parte del agente químico de atravesar las envolturas celulares antes de alcanzar sus dianas en el interior de las bacterias.

Para llevar a cabo los estudios de resistencia bajo las diferentes condiciones de crecimiento, se eligió como pH de trabajo 2.0, ya que permitía obtener una gráfica de supervivencia en un tiempo de trabajo adecuado.

4.2.1.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

A continuación se estudió la resistencia a jugo gástrico simulado (pH 2.0) con los cultivos crecidos en anaerobiosis, aerobiosis, a pH 7.0 constante y a pH 5.0 constante de ambas cepas obteniendo los siguientes resultados:

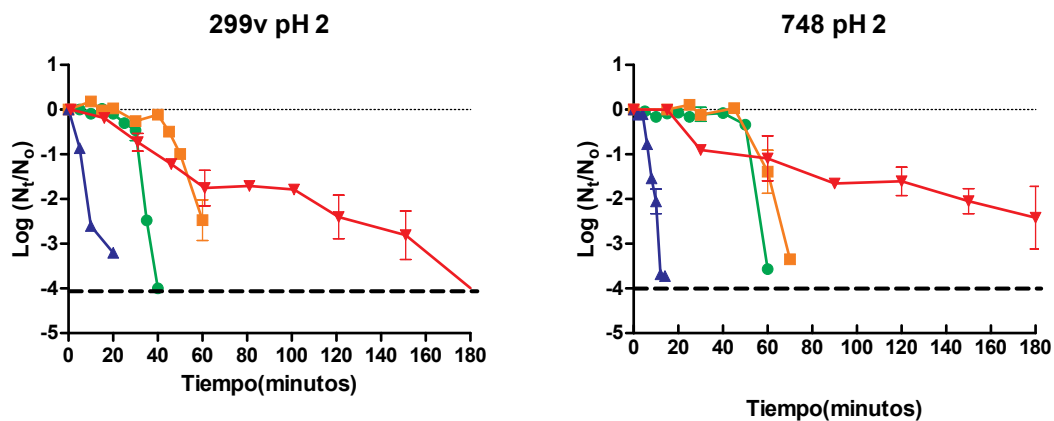


Figura 4.7: Gráficas de supervivencia frente al jugo gástrico simulado en condiciones de anaerobiosis(●), aerobiosis(■), pH 7 constante(▲), pH 5 constante(▼).

Como se puede observar en la gráfica, la influencia de las condiciones de crecimiento en la supervivencia al jugo gástrico fue similar para las dos cepas estudiadas. El cultivo obtenido a pH 7.0 fue el menos resistente. Por lo que respecta a la influencia de la presencia de oxígeno en el medio de cultivo, las células crecidas en aerobiosis mostraron mayor resistencia, si bien el efecto observado fue de pequeña magnitud.

Finalmente, las células crecidas a pH 5.0 mostraron la mayor capacidad de supervivencia frente al jugo gástrico simulado. Este efecto fue más evidente tras tiempos de exposición prolongados; por ejemplo, tras 120 minutos de tratamiento, se inactivaban únicamente 1.5 y 2.5 ciclos logarítmicos de la población de *L. plantarum* 748 y 299v respectivamente. Sin embargo para el resto de condiciones de cultivo el número de ciclos de inactivación superó los 4 ciclos definidos como límite de detección en el sistema experimental utilizado en este estudio.

Una observación importante es que los hombros que mostraban las gráficas de supervivencia frente al jugo gástrico de las células obtenidas en condiciones de aerobiosis y anaerobiosis a pH sin controlar, desaparecieron para aquellos cultivos obtenidos a pH controlado, 7.0 y 5.0. Estos resultados sugieren que las condiciones de cultivo, en particular el control del pH, provocan cambios en las células que determinan no solo su capacidad de supervivencia frente al jugo gástrico, sino también el modo por el cual dicho jugo gástrico inactiva a las células. El hecho de que las células cultivadas a pH 5.0 sean más resistentes que aquellas cultivadas a pH 7.0 era esperable, ya que se ha demostrado que la exposición continua a un pH ácido provoca respuestas adaptativas en los microorganismos, que adquieren resistencia a estreses ácidos aplicados posteriormente (Alvarez Ordoñez, *et al.*, 2008).

4.2.2. RESISTENCIA A LAS SALES BILIARES

4.2.2.1. CARACTERIZACIÓN

Del mismo modo que en la resistencia a jugo gástrico simulado, para el estudio de la resistencia a las sales biliares, se realizó un primer estudio exponiendo a las dos cepas a concentraciones crecientes de sales biliares, según se describe en el apartado 3.3.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.8.

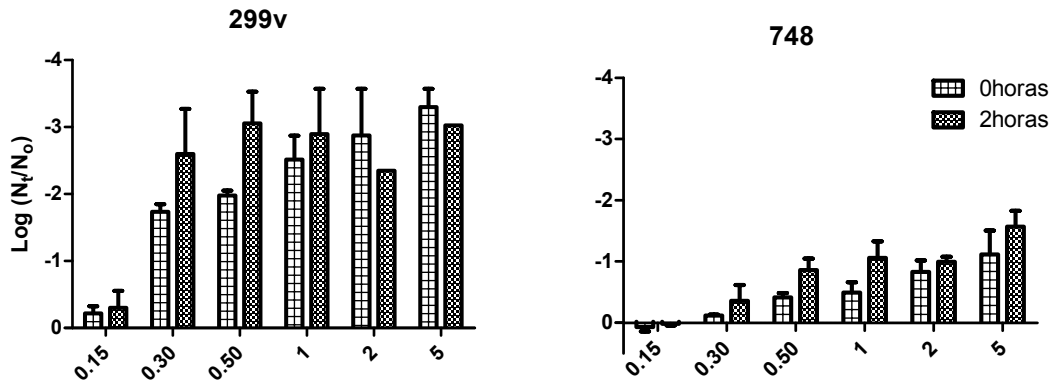


Figura 4.8: Fracción de supervivientes frente a sales biliares tras 0 y 2 horas de exposición a diferentes concentraciones

Como se puede observar, en este caso, la cepa 748 mostró una mayor resistencia a las sales biliares que la 299v, a pesar de ser esta última la cepa con capacidad probiótica probada. La supervivencia celular fue menor conforme aumentó la concentración de sales biliares. Aunque tras dos horas de exposición no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados correspondientes a concentraciones de entre 0.30 y 5% para la cepa 299v ($p < 0.05$). En ambas cepas, el mayor descenso en el número de supervivientes se produjo al inicio del experimento, sin embargo tras dos horas de ensayo los recuentos se mantuvieron prácticamente constantes. Este descenso inicial fue más acusado para la cepa *L. plantarum* 299v, de modo que concentraciones de 1, 2 y 5% produjeron una disminución de 2.5-3.5 ciclos logarítmicos en el número de células viables inmediatamente tras añadir el inóculo. En la cepa CECT 748, los ciclos de inactivación observados tras la exposición a esas mismas concentraciones fueron de entre 0.5 y 1.5 ciclos logarítmicos.

4.2.2.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

A continuación se estudió la influencia de las condiciones de cultivo, en anaerobiosis (pH sin controlar), aerobiosis (pH controlado), pH 7 constante

(aerobiosis) y pH 5 constante (aerobiosis), en la resistencia a las sales biliares (0.5% y 1 hora de exposición). Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.9.

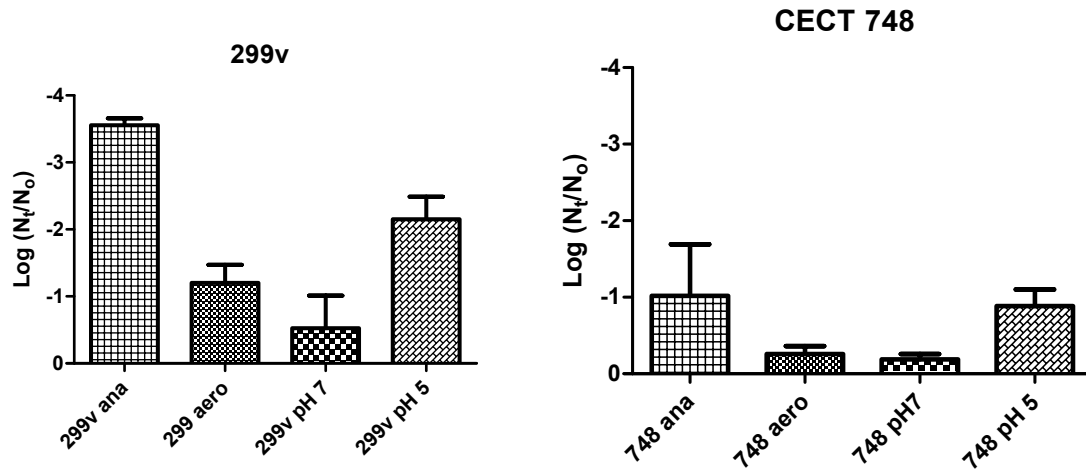


Figura 4.9: Fracción de supervivientes tras 1 hora de exposición frente a las sales biliares a concentración 0.5%

A diferencia de los resultados en la resistencia a jugo gástrico, se observa cómo las células crecidas a pH 5.0 en aerobiosis y las crecidas en anaerobiosis resultaban inactivadas en mayor grado que las crecidas en condiciones de aerobiosis a pH sin controlar o a pH 7.0. No obstante, únicamente se detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para la cepa 299v y entre las células crecidas en anaerobiosis y aerobiosis y entre las crecidas en anaerobiosis y pH 7. En el caso de la cepa 748 las diferencias no fueron estadísticamente significativas debido sin duda al bajo nivel de inactivación observado bajo las condiciones experimentales utilizadas dada la mayor resistencia de esta cepa. Por lo tanto, los resultados demuestran que aquellas condiciones de crecimiento que favorecen la supervivencia frente a la barrera estomacal (pH 5.0), no favorecen la supervivencia a las sales biliares. De igual modo, las células crecidas a pH 7.0, que se habían mostrado altamente sensibles al jugo gástrico, resultaron más tolerantes frente a las sales biliares,

al menos en la cepa 299v. Estos resultados sugieren que aquellos cambios celulares provocados por el pH del medio de crecimiento, y que incrementan la supervivencia celular al jugo gástrico, son diferentes a los que incrementarían la supervivencia a las sales biliares. Desde un punto de vista práctico, dados estos resultados, resulta difícil elegir unas condiciones de crecimiento que favorecieran la supervivencia a las dos barreras gastrointestinales.

4.3. COMPONENTES ANTIMICROBIANOS

Una de las propiedades que definen el carácter probiótico de un microorganismo es su capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. Esta propiedad es beneficiosa tanto durante la producción de alimentos fermentados, limitando la posibilidad de desarrollo de microorganismos indeseables, como una vez en el tracto gastrointestinal del consumidor, controlando a la flora patógena que puede colonizarlo. La acción antimicrobiana de los microorganismos lácticos se ha atribuido a distintas causas: la acción de los ácidos orgánicos y el pH ácido, la posible presencia de peróxido de hidrógeno secretado por las bacterias lácticas, o la síntesis de bacteriocinas, que ejercen su acción preferentemente sobre microorganismos Gram positivos.

En esta sección se investigó la capacidad antimicrobiana de las cepas de estudio de *L.plantarum*, con el objetivo de poder detectar la presencia de bacteriocinas y finalmente estudiar la influencia de las condiciones de crecimiento sobre su concentración en el cultivo.

En primer lugar, se comprobó mediante la técnica de doble capa de agar cómo *L.plantarum* era capaz de inhibir el crecimiento de cuatro cepas de microorganismos patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Typhimurium*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Ver Figura 3.4 y 3.5)

En todos los casos se observaron amplios halos de inhibición del crecimiento. Con objeto de caracterizar en mayor profundidad la naturaleza e importancia del efecto inhibitor, se llevaron a cabo una serie de experimen-

tos sobre un microorganismo Grampositivo (*Listeria monocytogenes*), y uno Gramnegativo (*Salmonella Typhimurium*). Se obtuvo el sobrenadante libre de células (SN1), neutralizado a pH 6.5 (SN2), neutralizado y digerido con catalasa (SN3), neutralizado, digerido con catalasa y con tripsina (SN4), y se realizaron experimentos de inhibición del crecimiento de los dos patógenos según la metodología descrita en la sección 3.4.

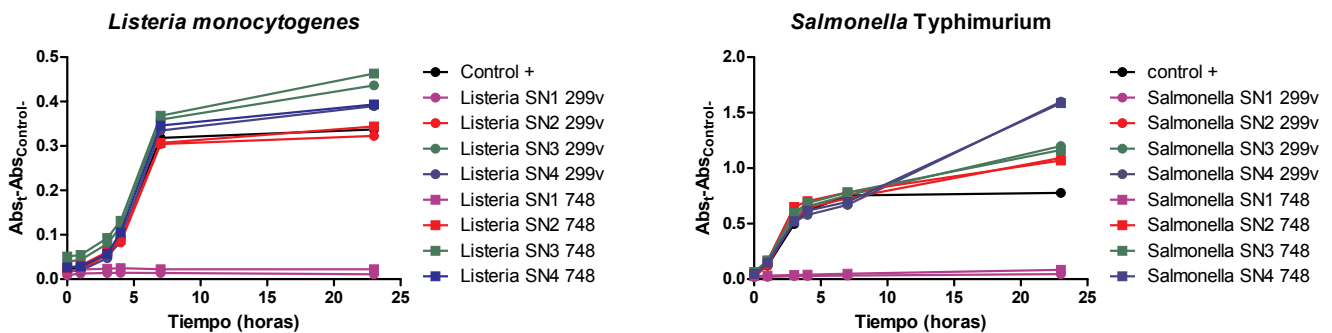


Figura 4.10: Ensayo antimicrobiano con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella Typhimurium*

La figura 4.10 muestra la evolución de la absorbancia en los pocillos con distintas muestras de sobrenadantes sobre los dos microorganismos patógenos. Como puede observarse en las figuras, tan sólo las muestras SN1 (sobrenadante centrifugado y filtrado, a pH 3.8) mostraron inhibición total del crecimiento de los patógenos. El resto de los sobrenadantes no tuvieron efecto en el crecimiento de los microorganismos. Se complementó el estudio enfrentando las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a los sobrenadantes SN1 y SN3 obteniéndose en todos los casos el mismo comportamiento.

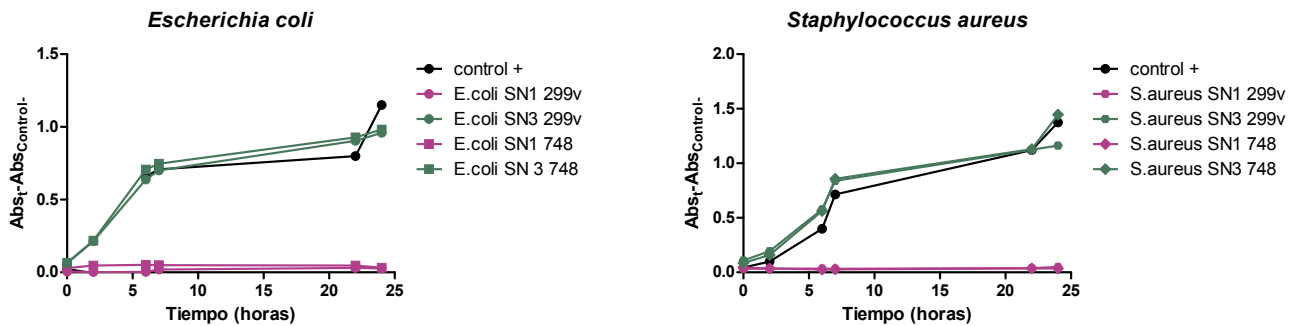


Figura 4.11: Ensayo antimicrobiano con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Se llegó por tanto a la conclusión de que el efecto inhibitorio era debido a los ácidos orgánicos producidos por *L.plantarum* durante el crecimiento. A pesar de que existen estudios (Gyu-Sung *et al.*, 2010) que demuestran la producción de bacteriocinas por la cepa 299v no se encontró este efecto en nuestro estudio. Ello puede ser debido a que las condiciones de crecimiento utilizadas no permiten la síntesis de bacteriocinas en nuestras dos cepas de *L.plantarum*, aunque tampoco podemos descartar que fuera necesario concentrar los sobrenadantes para poder evidenciar la presencia de bacteriocinas con nuestro sistema experimental. Otra posible razón es que las cepas de microorganismos patógenos elegidas no fueran sensibles a estas bacteriocinas ya que pueden ser específicas para ciertos microorganismos, en concreto, especies y cepas próximas que puedan competir entre ellas.

Por lo tanto, en un experimento futuro sería interesante preparar un screening previo con otras cepas lácticas, para poder detectar la presencia de bacteriocinas y poder evaluar la influencia de las condiciones de crecimiento en su producción.

4.4. UTILIZACIÓN DE DIFERENTES FUENTES DE CARBONO

Como se ha comentado en el capítulo 1, una de las principales características de *Lactobacillus plantarum* es su capacidad para fermentar gran variedad de hidratos de carbono, característica responsable de que este microorganismo sea uno de los predominantes en las fermentaciones de productos vegetales. La capacidad para utilizar diferentes fuentes de carbono es también una característica de gran importancia para la obtención de cultivos iniciadores, ya que determina qué materias primas pueden ser utilizadas como medio de crecimiento.

Se estudió la capacidad de las dos cepas de *L. plantarum* para crecer en caldo MRS suplementado con diferentes fuentes de carbono (2%), mediante la lectura de la absorbancia a 595 nm a lo largo del tiempo de incubación. Se utilizaron placas microtiter, con al menos tres réplicas por azúcar y cepa, inoculando en cada uno el mismo número de microorganismos. Los resultados se expresaron como la diferencia en absorbancia entre cada lectura y la lectura inicial, con objeto de corregir las diferencias en absorbancia de los distintos medios utilizados. Adicionalmente, se llevaron a cabo medidas de pH y recuentos microbianos tras 24 horas de incubación, a 37°C y en condiciones de aerobiosis. Se escogieron diversos hidratos de carbono con interés tecnológico (glucosa, fructosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrina y almidón) y probiótico (lactosa, rafinosa e inulina). En todos los casos se utilizó un control consistente en caldo MRS sin azúcares inoculado también con la cepa correspondiente. Las curvas de crecimiento obtenidas se muestran en la Figura 4.12.

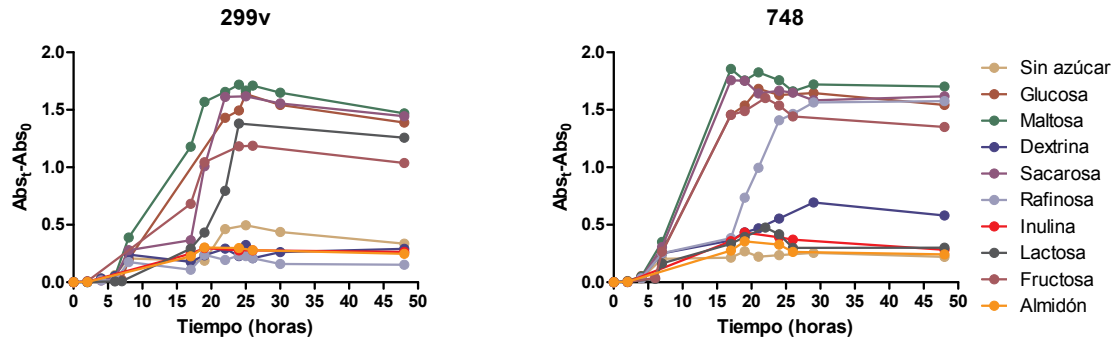


Figura 4.12: Curvas de crecimiento de *L.plantarum* en presencia de diferentes azúcares.

Los resultados muestran que el patrón de consumo de fuentes de carbono fue distinto para las dos cepas estudiadas. En los dos casos, los hidratos de carbono más rápidamente utilizados fueron la maltosa, seguido de glucosa, sacarosa y fructosa. Por lo que respecta a los hidratos de carbono más complejos, dextrinas y almidón, ninguna de las dos cepas fue capaz de utilizarlos con eficiencia. Las curvas de crecimiento parecen mostrar cierta utilización de las dextrinas, sobre todo en la cepa 748. No obstante, las medidas de pH y de recuento microbiano (Figura 4.13) muestran que los valores de pH en los cultivos control (sin azúcares), con dextrina y con almidón apenas se modificaron y se mantuvieron cercanos a 6.0, mientras que en el caso de los cultivos suplementados con glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa alcanzaron valores de 3.6-3.8. De igual modo, los recuentos finales obtenidos fueron mayores, del orden de 10^9 ufc/ml para estos cuatro azúcares. Estos resultados indican que las dos cepas estudiadas fermentaron eficientemente la glucosa, la sacarosa, la fructosa y la maltosa con producción de ácidos, previsiblemente ácido láctico. Sin embargo, no utilizaron azúcares más complejos como los almidones y oligosacáridos como la dextrina, que son también componentes importantes de los productos de origen vegetal, y cuya utilización se ha demostrado en otras cepas lácticas próximas (Gyu-Sung *et al.*, 2010).

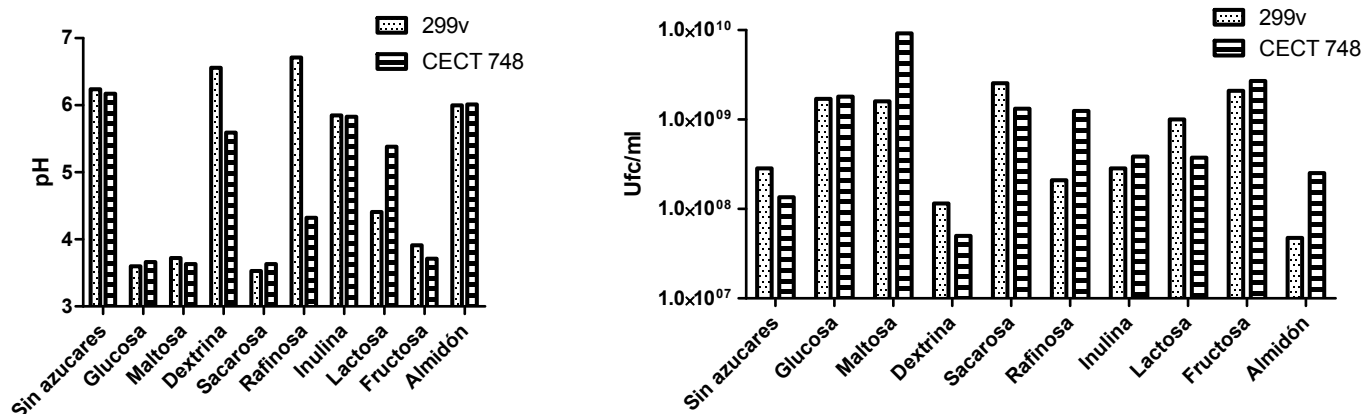


Figura 4.13: pH y recuento de microorganismos alcanzado tras 24 horas de incubación con diferentes hidratos de carbono

Por otro lado, en las gráficas se observa que la utilización de la lactosa fue distinta para las dos cepas. Mientras que la cepa 748 no la metabolizó, la cepa 299v sí lo hizo, si bien a una velocidad inferior al uso de otros azúcares como por ejemplo la maltosa o la sacarosa, también disacáridos. Estos resultados indican que la cepa 748 no sería un buen cultivo iniciador para fermentar materias primas lácteas, dada esta incapacidad de fermentar la lactosa. Desde el punto de vista probiótico, la degradación de la lactosa es un carácter interesante, ya que está comprobado que la colonización intestinal por parte de bacterias con actividad β -galactosidasa disminuye los efectos adversos de la intolerancia a la lactosa.

Por otro lado, ninguna de las dos cepas estudiadas fue capaz de metabolizar la inulina. El hecho de que no se metabolice la inulina tiene un efecto negativo desde el punto de vista probiótico, ya que se trata de un polisacárido de origen vegetal que ejerce de prebiótico a nivel intestinal, actuando como sustrato selectivo para la microbiota beneficiosa, y favoreciendo el asentamiento de bifidobacterias y lactobacilos (Bosscher *et al.*, 2009). Por último, se observaron diferencias en la capacidad de utilización de la rafinosa. La rafinosa, junto con la verbascosa y la estaquiosa, es un oligosacárido presente

principalmente en vegetales y legumbres, cuya escisión requiere del enzima α -galactosidasa, que no está presente en nuestro intestino. Su presencia en el intestino provoca flatulencia debido a la utilización por parte de bacterias productoras de gas. Las bacterias lácticas capaces de utilizar estos oligosacáridos, como *L. plantarum* CECT 748, ejercen un efecto beneficioso, ya que son capaces bien de utilizarlos durante el proceso de fermentación de las materias primas alimentarias, como por ejemplo, una matriz a base de soja, o bien en el propio intestino, produciendo ácidos de cadena corta como principales metabolitos, evitando por tanto la formación de gas.

CONCLUSIONES

1. El comportamiento de las dos cepas de *L. plantarum* con respecto a las modificaciones en las condiciones de crecimiento es similar. Las tasas de crecimiento más bajas se obtuvieron en condiciones de aerobiosis a pH 7.0, y los recuentos máximos en fase estacionaria se obtuvieron en condiciones de anaerobiosis sin control de pH y en aerobiosis a pH 5.0. No obstante los máximos recuentos difirieron en, como máximo, 0.5 ciclos logarítmicos entre las cuatro condiciones de crecimiento y las dos cepas utilizadas.

2. Las condiciones de obtención del cultivo modifican la capacidad de supervivencia de *L. plantarum* al jugo gástrico, y del mismo modo para las dos cepas estudiadas.

3. Las células obtenidas en condiciones de pH 5.0 mostraron una mayor capacidad de supervivencia al jugo gástrico en comparación a las obtenidas a pH 7.0, en las dos cepas estudiadas.

4. La obtención de los cultivos en condiciones de anaerobiosis, en comparación a las condiciones de aerobiosis, provocó una disminución en la resistencia a las sales biliares de *L. plantarum* 299v.

5. La cepa *L. plantarum* 299v mostró menor resistencia a las sales biliares que la cepa CECT 748.

6. Las dos cepas de *L. plantarum* son capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos de interés alimentario como *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus* y *E. coli*. El efecto inhibidor del crecimiento que se ha observado es debido al pH ácido del caldo de cultivo.

7. El patrón de fermentación de azúcares dependió de la cepa. Así, se observaron diferencias en la capacidad de utilización de rafinosa y de lactosa. Ninguna de las dos cepas estudiadas sería un buen cultivo iniciador para fermentar productos de origen lácteo, por el contrario, las dos cepas mostraron

capacidad de fermentar azúcares abundantes en los productos vegetales, a excepción de dextrinas y almidón.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] SALMINEN MK, RAUTELIN H, TYNKKYNNEN S, POUSSA T, SAXELIN M, VALTONEN V, JARVINEN A.. Lactobacillus bacteremia, clinical significance, and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG. (2004) Clin Infect Dis. 38:62-9.
- [2] ALVAREZ-ORDÓÑEZ A, Fernández A, López M, Arenas R, Bernardo A. Modifications in membrane fatty acid composition of *Salmonella typhimurium* in response to growth conditions and their effect on heat resistance. (2008) Int J Food Microbiol 30;123(3):212-9
- [3] ARCHIVALD F, FRIDOVICH I. Manganese and Defenses against Oxygen Toxicity in *Lactobacillus plantarum*. (1981) Journal of Bacteriology 145, 442-451
- [4] BARTHELMEBS L, DIVIES C. Knockout of the p-Coumarate Decarboxylase Gene from *Lactobacillus plantarum* Reveals the Existence of Two Other Inducible Enzymatic Activities Involved in Phenolic Acid Metabolism. (2000) Appl Environ Microbiol, 66, 3368-3375
- [5] BOSSCHER D, BREYNAERT A, PIETERS L, HERMANS N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. (2009) Food Microbiol 60 6:5-11.
- [6] CEBRIÁN, G., SAGARZAZU, N., PAGÁN, R., CONDÓN, S, MAÑAS, P. Resistance of *Escherichia coli* grown at different temperatures to various environmental stresses. (2008) J. Appl. Microbiol. 105, 271-278.
- [7] DAWSON RMC, ELLIOT D, ELLIOT WH, JONES KM. (1969) Data for Biochemical Research Oxford University Press
ISBN: 0 19 855338 2

- [8] DE VUYST L, LEROY F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications.(2007) J Mol Microbiol Biotechnol 13:194-199
- [9] ESSID I, MEDINI M,HASSOUNA M. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. (2009) Meat Sci. 81:203-8
- [10] FORDYCE AM, CROW VL, THOMAS TD. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. (1984) Appl Environ Microbiol 48:332-7.
- [11] GIBSON GR, PROBERT HM, LOO JV, RASTALL RA, ROBERFROID MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics.(2004) Nutr Res Rev. 17(2):259-75.
- [12] GIBSON AM, BRATCHELL N, ROBERTS TA. Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature. (1988) Int. J. Food Microbiol. 6:155-178
- [13] GOOSSENS DA, JONKERS DM,RUSSEL MG, STOBBERINGH EE, STOCKBRUGGER RW. The effect of a probiotic drink with *Lactobacillus plantarum* 299v on the bacterial composition in faeces and mucosal biopsies of rectum and ascending colon. (2006) Aliment Pharmacol Ther. 145, 442-451
- [14] GYU-SUNG CHO, MELANIE HUCH, ALEXANDER HANAK, WILHELM H. HOLZAPFEL y CHARLES M.A.P FRANZ. Genetic analysis of the plantaricin EFI locus of *Lactobacillus plantarum* PCS20 reveals an unusual plantaricin E gene sequence as a result of mutation. (2010) International Journal of Food Microbiology 141 S117

- [15] HOFVENDAHL K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. (2000) (2000) 87-107 *Enzyme and Microbial Technology* 26 87-107
- [16] HUTKINS R *Microbiology and technology of Fermented foods.* (2006) Blackwell Publishing
ISBN-13: 978-0-8138-0018-9
- [17] JOHANSSON ML, MOLIN G. Administration of Different *Lactobacillus* Strains in Fermented Oatmeal Soup: In Vivo Colonization of Human Intestinal Mucosa and Effect on the Indigenous Flora (1993) *Appl Environ Microbiol.* 59, 15-20
- [18] KAZUAKI IWAMOTOA, HIROKI TSURUTAB, ALEXANDER HANAK, WILHELM H. HOLZAPFEL y CHARLES M.A.P FRANZ. Identification and cloning of a gene encoding tannase (tannin acylhydrolase) from *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917 (2008) *Systematic and Applied Microbiology* 31, 269-277
- [19] KLEEREBEZEM M y BOEKHORST J. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. (2003) *PNAS* 100, 1990-1995
- [20] MÄYRÄ-MÄKINEN, A., *Bigret, M.* Industrial use and production of acid lactic bacteria. (1993) pp. 65-95
ISBN 0-8247-8907-5
- [21] MERCENIER A, PAVAN S, POT B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. (2003) *Curr Pharm Des* 9(2):175-91
- [22] MOZZI F, RAYA R y VIGNOLO G. *Biotechnology of lactic acid bacteria. Novel applications.* (2010) Ed. Wiley Blackwell
ISBN 978-0-8138-1583-1

- [23] VINDEROLA CG, REINHEIMER JA. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. (2003) Food Research International 36, 895-904
- [24] ZAGO M., FORNASARI ME, CARMINATI D, BURNS P, SUÁREZ V, VINDEROLA G, REINHEIMER J, GIRAFFA G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. (2008) Int J Food Microbiol 30;123(3):212-9
- Dawson MRC. 1974