



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN CAMPO 1

“Aislamiento e identificación de bacterias probióticas a partir del gorgojo chino y sus usos potenciales en la elaboración de alimentos nutraceuticos.”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA INDUSTRIAL

P R E S E N T A:

JESSICA CASTILLO BALTAZAR

ASESORA:

DRA. RAQUEL GÓMEZ PLIEGO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2018



UNAM
CUAUTITLÁN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México:

Por abrirme las puertas a esta maravillosa casa de estudios y brindarme la oportunidad de desarrollarme tanto académica como personal, permitiéndome conocer y vivir todo lo que rodea a esta gran universidad.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán:

Por proporcionarme educación de primer nivel y la cercanía a mi hogar que me ayudo salir adelante en mi desarrollo académico, agradezco a todos los profesores que me enseñaron mucho más que asuntos académicos, a los recursos que me brindo la facultad para mi formación profesional como Química Industrial.

A mi asesora Dra. Raquel Gómez Pliego:

Por el conocimiento y sabiduría que me ha compartido, encontré además de un mentor a una amiga, agradezco su tiempo y paciencia para la realización de este trabajo y aún más por los consejos invaluable que me ha dado.

A mi compañera Alondra Martínez Pérez

Por brindarme su valioso apoyo en el trabajo experimental.

A los honorables miembros del jurado:

M. en C. Tais Nopal Guerrero, I.A. Miriam Álvarez Velasco, M. en C. María Guadalupe Amaya León, M. en C. Selene Pascual Bustamante. Por su amable atención a la presentación de mi trabajo y la valoración que me ortogaron al mismo, les agradezco sus consejos y observaciones para la culminación de mi tesis.



Dedicatorias

La presente tesis se la dedico a mi familia que gracias a su amor y apoyo pude concluir mi carrera. **A mi mamá, Rocío Baltazar Elizarraraz** por ser la persona que me ha acompañado durante todo mi trayecto estudiantil y vida, tu esfuerzo en sacarnos adelante se refleja en nuestro éxito, mi éxito que tendre ahora en adelante será tu éxito gracias mamá por tu ayuda incondicional. **A mi papá y a mis hermanos** por su apoyo y confianza, gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y estudiante.

A mi novio, Luis Diego Camarena Escudero, te dedico este trabajo porque desde antes que yo entraré a esta universidad me diste tu incondicional apoyo en los trámites de inscripción, me acompañaste en la elaboración de mi examen de admisión y desde que inicie mi carrera has estado a mi lado en las buenas y en las malas experiencias. Agradezco tu amor y paciencia.

Te Amo Diego



Índice General	Página
Resumen	1
1. Objetivos	3
1.1 General	3
1.2 Específicos	3
2. Introducción	4
3. Marco teórico	5
3.1 Generalidades de los Gorgojos chinos <i>Ulomoides dermestoides</i>	5
3.1.1 Colepteroterapia	5
3.1.2 Informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México	6
3.2 Bacterias ácido lácticas (BAL)	7
3.2.1 Características generales	8
3.2.2 Metabolismo	8
3.2.3 Clasificación y géneros representativos	11
3.2.4 Métodos de estudio clásicos	14
3.2.5 Características fermentativas de las bacterias lácticas	15
3.2.6 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL	24
4. Justificación	37
5. Hipótesis	38
6. Metodología	39
7. Resultados	50
8. Análisis de resultados	53
9. Conclusiones	64
10. Referencias	65
11. Anexos	82



No. de Tabla	Índice de Tablas	Página
1	Bacterias ácido lácticas homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas.	11
2	Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud.	16
3	Microorganismos usados como probióticos.	17
4	Beneficios en la salud de los consumidores atribuidos a los probióticos.	17
5	Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.	23
6	Usos de las principales bacterias ácido lácticas en alimentos.	24
7	Compuestos inhibitorios producidos por BAL y su mecanismo de acción.	25
8	Bacteriocinas y microorganismos productores.	31
9	Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismos sensibles.	31
10	Bacteriocinas de uso potencial aplicadas en los alimentos.	36
11	Preparación de nefelómetro de MacFarland	46
12	Caracterización microbiológica y bioquímica de las cepas aisladas.	51
13	Géneros identificados de las cepas aisladas de acuerdo Shillinger y Lücke (1989).	53
14	Identificación bioquímica de las cepas BAL con el sistema API 50 CHL.	53
15	Identificación bioquímica de las cepas BAL con el sistema API 20 Strep.	54
A	Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas.	82
B	Sustratos contenidos en la galería API 50 CHL.	83
C	Identificación API 20 Strep.	84



No. de Figura	Índice de Figuras	Página
1	Fotografía de <i>Ulomoides dermestoides</i> . Detalle de la tibia y traso de la pata izquierda del primer par de patas.	6
2	Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.	9
3	Vía heterofermentativa de la glucosa por BAL.	10
4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> .	12
5	<i>Streptococcus thermophilus</i> .	13
6	Productos fermentados.	22
7	Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III).	29
8	Diagrama de flujo del procedimiento de aislamiento de BAL a partir del gorgojo chino y pruebas bioquímicas primarias y secundarias.	40
9	Diagrama de flujo del procedimiento de la identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante los sistemas API 50 CH, API 50 CHL y API 20 Strep.	41
10	Cepas BAL aisladas.	42
11	Resultado de Tinción Gram.	43
12	Resultado de catalasa (A): negativo, (B): positivo.	43
13	Resultado de oxidasa (A): positivo, (B): negativo.	44
14	Resultado de CO ₂ (A): positivo, (B): negativo.	44
15	Galería API CH con medio de cultivo API 50 CHL inoculado con una cepa ácido láctica.	46
16	Expresión de resultados por cambio de color del medio API 50 CHL. Donde: azul: negativo, amarillo y negro: positivo, verde: dudoso.	46
17	Expresión de resultados al añadir los reactivos al medio API 20 Strep. Donde: amarillo y negro: positivo, blanco y rojo: negativo.	48



No. de Figura	Índice de Figuras	Página
18	Cepas conservadas en pico de flauta con agar MRS.	48
19	Determinación de acidez titulable.	49
20	Diagrama de flujo para la identificación de géneros BAL por características fenotípicas.	50
21	Estructuras del ácido linoleico y los isómeros biológicamente activos más comunes del ALC.	57
22	Posibles mecanismos de tumorigénesis alterada por ALC.	58
23	Modelo de los efectos de <i>trans</i> -10, ácido linoleico conjugado con <i>cis</i> -12-ALC en adipocitos y preadipocitos.	59



Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
ALC	Ácido Linoleico Conjugado
APT	Agar peptona tamponada
Asn	Asparagina
ATP	Adenosín trifosfato
BAL	Bacterias Ácido Láctica
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Coenzima A
COX	ciclooxigenasa
Cys	Cisteína
Dha	Dehidroalanina
Dhb	Dehidrobutirina
DM	Diabetes <i>Mellitus</i>
DM 2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
EFSA	Acrónimo en Inglés, European Food Safety Authority
EMP	Embden-Meyerhof-Parnas
EPS	Expolisacáridos
FDA	Acrónimo en Inglés, Food and Drug Administration
FMP	Fuerza motriz de protones
Gly	Glicina
GRAS	Acrónimo en Inglés, Generally reconized as safe
h	Horas
H ⁺	Hidrógeno
HCl	Ácido Clorhídrico



Lista de abreviaturas

IgA	Inmunoglobulina A
kDA	Unidad de masa atómica, kiloDalton
Lan	Lantionina
LOX	5-lipoxigenasa
M	Concentración molar
MeLan	α -metil-lantionina
min	Minutos
mL	Mililitros
MRS	Acrónimo en Inglés , Man, Rogosa y Sharpe
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
P	Fósforo
PGE2	prostaglandina E2
pH	$-\log [H_3O^+]$
Pi	Fósforo inorgánico
seg	Segundos
SM	Síndrome metabólico
TB2	tromboxano B2
TG	triglicéridos
Tyr	Tirosina
Val	Valina
Xaa	Aminoácido arbitrario



Resumen

Los gorgojos chinos, conocidos como *Ulomoides dermestoides*, se han empleado de manera popular y tradicional en muchas partes del mundo en el tratamiento de enfermedades respiratorias, artritis, cáncer, diabetes, etc. Las personas que han consumido este coleóptero como un tratamiento casero aseguran haber mejorado en su salud.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar, purificar e identificar mediante técnicas y pruebas microbiológicas el género y especie de bacterias ácido lácticas (BAL) presentes en la microbiota del gorgojo chino y correlacionar las bacterias aisladas e identificadas con el efecto benéfico que pudieran conferirle al consumidor, y su potencial uso en la elaboración de alimentos con propiedades nutraceuticas. Hasta ahora, no se han realizado estudios sobre el tipo de microbiota presente en el gorgojo chino y tampoco se sabe si esta pudiera ser del tipo de las BAL, mas aún, no existen reportes que indiquen si el efecto benéfico que se les atribuye pudiera estar relacionado con la presencia de este tipo de bacterias.

Para el aislamiento de las BAL, los gorgojos se trituraron en solución salina fisiológica estéril, se sembraron y purificaron en medios de cultivo selectivos y diferenciales. Para la identificación del género y especie se realizaron pruebas bioquímicas primarias y secundarias empleando el sistema API 50 CHL, API 50 CH, API 20 Strep, se evaluó el crecimiento a diferentes pHs, temperaturas y concentraciones de sal, así como la producción de gas a partir de glucosa como fuente de carbono.

Dentro de los resultados obtenidos se aislaron e identificaron un total de 10 BAL, 2 de *Lactobacillus plantarum*, 2 de *Pediococcus pentosaceus*, 2 de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus raffinolactis* y *Streptococcus thermophilus*; de las cuales existen reportes que indican que poseen propiedades probióticas y se encuentran dentro de la clasificación GRAS (Generally Recognized as Safe). Datos de la literatura indican que cuando este coleóptero es consumido vivo producen benzoquinonas, crotocinas, pentadecenos, hidroquinonas, terpenos, ácidos graso, colesterol y ésteres (Estévez et al., 2017; Deloya-Brito y Deloya, 2014), como mecanismo de defensa al pH ácido del estomago.

Estos compuestos junto con las BAL pudieran actuar *per se* o en simbiosis y generar un efecto sinérgico que potencie el efecto benéfico en la salud de quienes lo consumen y ese efecto de bienestar en la salud que indican tener los consumidores que los utilizan como medicina alternativa, (Coleoterapia).

Finalmente, con las bacterias aisladas y caracterizadas se elaboraron bebidas fermentadas las cuáles presentaron buenas características sensoriales, consistencia, textura y un excelente aroma, sin embargo es importante realizar más estudios para mejorar las formulaciones.



Abstract

Tenebrionid beetles known as *Ulomoides dermestoides*, has been used in a popular and traditional way in many parts of the world in the treatment of respiratory diseases, arthritis, cancer, etc. The people who have consumed this coleopter as a home treatment claim to have improved their health.

The present work aims to isolate, purify and identify from *Ulomoides dermestoides* bacteria with probiotic activity such as lactic acid bacteria (LAB) and its application in the development of new fermented foods with nutraceutical properties. So far, there are no studies on the content of LAB in *U.dermestoides* or reports that indicate if the beneficial effect attributed to them could be related to these bacteria. For the isolation of the LAB, *U.dermestoides* were crushed in sterile physiological saline, seeded and purified in selective and differential culture media, for the identification of the genus and species, primary and secondary biochemical tests were performed, API 50 CHL, API 50 CH and API 20 Strep were used.

Once identified and characterized, fermented drinks were elaborated which presented good sensorial characteristics, consistency, texture and an excellent fragrance. however, it is important to carry out more studies to improve the formulations.



1. Objetivos

1.1 General

Aislar, purificar e identificar mediante técnicas y pruebas microbiológicas el género y especie de bacterias ácido lácticas (BAL) a partir del gorgojo chino (*Ulomoides dermestoides*) y su potencial uso en la elaboración de alimentos con propiedades nutraceuticas.

1.2 Específicos

- 1.2.1 Aislar bacterias ácidos lácticos a partir del gorgojo chino en medios diferenciales y selectivos.
- 1.2.2 Seleccionar las cepas bacterianas aisladas de acuerdo a morfología colonial y microscópica.
- 1.2.3 Realizar pruebas bioquímicas primarias (Gram, catalasa, oxidasa) para identificar el posible género microbiano.
- 1.2.4 Determinar el crecimiento de las cepas seleccionadas a diferentes pHs (4.4 y 9.6), temperaturas (10 y 45 °C), concentración de NaCl (6.6 y 18 %) y producción de CO₂ en caldo MRS con glucosa al 5%.
- 1.2.5 Mediante el sistema API 50 CH y API 20 Strep identificar la especie de las cepas seleccionadas y confirmar el género propuesto.
- 1.2.6 Elaborar bebidas lácticas fermentadas a partir de las BAL aisladas, y evaluar sensorialmente textura, consistencia y olor.



2. Introducción.

Existen reportes antagónicos que indican que los gorgojos chinos (*Ulomoides dermestoides*) pueden ser usados en el tratamiento de diferentes enfermedades, mientras que otros les atribuyen efectos perjudiciales, sin embargo, éstos han sido ampliamente consumidos vivos en diferentes partes del mundo, como una forma de medicina alternativa denominada coleoterapia, usada en el tratamiento de enfermedades como asma, Parkinson, diabetes *mellitus*, artritis y cáncer, por mencionar algunas (Estévez *et al.*, 2017; Tobón, 2011). Datos de la literatura indican que los efectos benéficos que se les atribuyen pudieran estar relacionados con la producción de benzoquinonas, crotoxinas, pentadecenos, hidroquinonas, terpenos, ácidos graso, colesterol y ésteres (Estévez *et al.*, 2017; Deloya-Brito y Deloya, 2014; Crespo, 2011), sustancias que producen como mecanismo de defensa durante su muerte en el organismo de los consumidores, sin embargo, faltan investigaciones que confirmen el efecto curativo por la ingestión de estos insectos. Actualmente no existen estudios que revelen si estos insectos poseen algún tipo de bacterias benéficas para los seres humanos que se encuentran formando parte del microbioma de estos insectos, tales como las Bacterias Ácido Lácticas (BAL), (Deneysa *et al.*, 2015; Owen *et al.*, 2004), y que sean las que favorezcan la colonización de bacterias benéficas y disminuyan el ataque de patógenos de la Microbiota del Tracto Gastrointestinal (MTG) de quienes los consumen. La MTG regula el sistema inmune, el metabolismo anaeróbico de péptidos y de proteínas lo que se traduce en la recuperación de la energía metabólica para el huésped, favorece la formación y desarrollo de los macrovellosidades intestinales y desdoblamiento de polisacáridos no digeribles (fibras) (Robles y Guarner, 2013; Molinaro *et al.*, 2012). Asimismo, la MTG juega un papel crucial en el desarrollo de desórdenes metabólicos: Síndrome Metabólico (SM), obesidad, Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e hipertensión (Lui *et al.*, 2012; Molinaro *et al.*, 2012), y de ahí la importancia de que se encuentre colonizada con éste tipo de bacterias BAL.

3. Marco teórico

3.1 Generalidades de los Gorgojos chinos *Ulomoides dermestoides*.

El coleóptero *Ulomoides dermestoides*, también conocido como gorgojo chino, es un insecto de la familia *Tenebrionidae*, originario de China que fue introducido en Colombia y Argentina desde hace varias décadas como remedio natural antiasmático. El uso de este insecto como remedio por parte de personas enfermas despertó el interés de entomólogos biólogos y profesionales de la salud. El *U. dermestoides* se reproduce adecuadamente en los granos de maní (*Arachis hypogaea* L.), maíz (*Zea mays* L.), arroz (*Oriza sativa* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* L.), frijol (*Vigna radiata*) y soya (*Glycine max*), (Londoño, 1992). Según la referencia popular en China y Malasia, las heces de este insecto se utilizan para curar indigestiones, afecciones cardíacas, dolores musculares, enfermedades renales, asma, en el tratamiento de una variedad de infecciones y como afrodisíaco ingiriéndose vivo (Garcés *et al.* 2009; Chu *et al.*, 1997; Chua y Chandrepal, 1978).

3.1.1 Coleoterapia.

En la medicina tradicional de varios países latinoamericanos, se conoce como la coleoterapia la ingestión de escarabajos con fines terapéuticos para tratar los síntomas de una amplia gama de enfermedades como asma, artritis, cáncer, diabetes, enfermedades de Parkinson, psoriasis, quistes de ovario, reuma, entre otras (Estévez *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2010; Kriton, 2008).

Aunque no existen referencias sobre el seguimiento clínico y/o experimentación científica en los casos de pacientes que practican la coleoterapia, su uso y eficacia se divulga a partir de testimonios (Kriton, 2008). Algunos estudios han demostrado que las secreciones defensivas del *Ulomoides dermestoides* son benzoquinonas, crotoxinas, pentadecenos, hidroquinonas, terpenos, ácidos grasos, colesterol y ésteres producidas por glándulas localizadas en su abdomen que muestran actividad antiinflamatoria en experimentos farmacológicos (Estévez *et al.*, 2017; Tobón *et al.*, 2011; Deloya-Brito y Deloya, 2014; Wahrendorf y Wink, 2006).

De igual forma, el extracto acuoso de *Ulomoides dermestoides* aplicado intrapleuralmente en dosis de 12.5 mg/dL, ha demostrado su efectividad como agente

antiinflamatorio en ratas Wistar hembras con pleuritis inducida y artritis reumatoide. Esta propiedad, posiblemente, explica en parte el uso tradicional del escarabajo (Estévez *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2010; Wahrendorf y Wink, 2006).

3.1.2 Informe de un caso en Ixtapa, Jalisco, México.

El autor Santos *et al.*, en el 2010, tuvieron la oportunidad de examinar tres larvas y nueve adultos de un cultivo doméstico para consumo personal, realizado por una residente de Ixtapa, municipio de Puerto Vallarta, Jalisco. Los ejemplares se determinaron como *Ulomoides dermestoides* (**Figura 1**) con la clave de Spilman (1987) y el trabajo de Ferrer (1988). Estos insectos son conocidos como “escarabajos del asma” (Kriton, 2008). Los especímenes se depositaron en la Colección Entomológica del Centro de Estudios en Zoología de la Universidad de Guadalajara, México (CZUG).

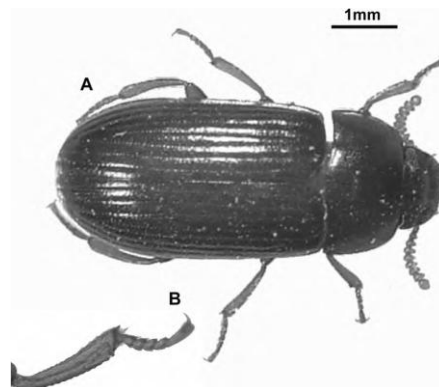


Figura 1. Fotografía de *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878).

La persona que proporcionó los coleópteros para la determinación taxonómica, una mujer de 48 años con tres hijos y diagnosticada desde hace cuatro años con fibromialgia y osteoartritis; comentó que seis meses atrás inició coleoterapia (aunada al tratamiento prescrito por su médico). Dijo experimentar una mejora significativa en su salud, mayor a la que le proporcionaba la medicina convencional, condición que atribuyó a la ingestión de ejemplares vivos de estos coleópteros. Su tratamiento ha consistido en tragar un coleóptero el primer día y aumentar progresivamente la dosis hasta llegar a los 70 para después reducir la cantidad hasta llegar de nuevo a uno diario repitiendo varias veces dicha secuencia. Si bien en el país existe evidencia



sobre el uso del coleópteros para tratar enfermedades (Ramos, 2004), la presente nota cita por vez primera la práctica de la coleoterapia al ingerir *Ulomoides dermestoides* como medicina tradicional.

Aunque esta observación no es una evaluación científica de la efectividad de la coleoterapia (debido a que no presenta mediciones cuantitativas o cualitativas sobre efectos en los síntomas del paciente), es de gran interés el documentar su práctica en esta región de México; donde adicionalmente existen otros artrópodos usados como medicina (Costa *et al.*, 2006; Pagasa *et al.*, 2006; Ramos, 2004), lo cual aunado a la relevancia de los extractos *Ulomoides dermestoides* como agentes antiinflamatorios (Santos *et al.*, 2010; Wahrendorf y Wink, 2006), plantea la necesidad de estudiar clínicamente este tipo de casos.

Una investigación reciente del Instituto Politécnico Nacional valida científicamente el uso empírico del consumo del gorgojo chino, la investigación realizada por Estévez *et al.*, en el 2017, realizaron un estudio farmacológico y toxicológico basados en el método científico para corroborar la efectividad terapéutica del insecto atribuida por los consumidores, una vez que se garantizó su inocuidad, se administraron diferentes dosis en ratas Wistar con artritis reumatoide. Para facilitar su ingesta, se obtuvo un polvo liofilizado del insecto, el cual se diluyó con agua purificada y se le administró vía oral a las ratas. Se observaron procesos antiinflamatorios importantes con dosis pequeñas y conforme se incrementó la dosis, la mejora aumentó. Se comprobó con seguridad del polvo con un estudio de toxicidad aguda en ratones, a los que se administraron altas dosis del insecto (Estévez *et al.*, 2017).

3.2 Bacterias ácido lácticas (BAL).

Orla-Jensen en 1919, elaboró una monografía en la que apunta que las bacterias del ácido láctico constituyen un grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados, no reducen nitratos, son catalasa negativas y oxidasa negativas, sin citocromos, anaerobias facultativas y estrictas, y se caracterizan por la producción de cantidades importantes de ácido láctico como resultado del metabolismo de los hidratos de carbono.

3.2.1 Características generales.

Las BAL se caracterizan por numerosas exigencias nutricionales, ya que pueden crecer en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono como la leche, productos lácteos, vegetales en descomposición, carnes, etc. Las vitaminas necesarias están presentes en la leche en concentraciones generalmente suficientes pero con la adición de extracto de levadura rico en vitaminas teniendo un efecto estimulante sobre el crecimiento bacteriano (Priscilia *et al.*, 2017; Leveau y Bolix, 2000).

Según el criterio taxonómico genético existen 12 géneros de bacterias lácticas que comprenden *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Carnobacterium* y *Weissella* (Ramírez *et al.*, 2011; Fox *et al.*, 2000). Algunos géneros de BAL pueden ser considerados como microorganismos probióticos, los cuáles al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico a la salud del huésped (FAO/OMS, 2006).

3.2.2 Metabolismo

Con base a los productos finales del metabolismo de la glucosa, las BAL se dividen en dos grupos:

1. Las homofermentativas, que producen ácido láctico como producto principal o único de la fermentación de la glucosa (**Figura 2**). Utilizan la vía de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Las bacterias homolácticas poseen las enzimas aldosa y hexoisomerasa, pero carecen de fosfoctolasa. Así mismo, es posible cambiar el carácter homofermentativo de las bacterias modificando condiciones de cultivo como la concentración de glucosa, el pH y la restricción de nutrientes (Parra, 2010; Leveau y Bouix, 2000).
2. Las heterofermentativas (**Figura 3**) son las que transforman la glucosa a partir de las hexosas, en ácido láctico, etanol, ácido acético, ácido fórmico, succinato, y dióxido de carbono (CO₂) (Parra, 2010; Axelsson, 1993).

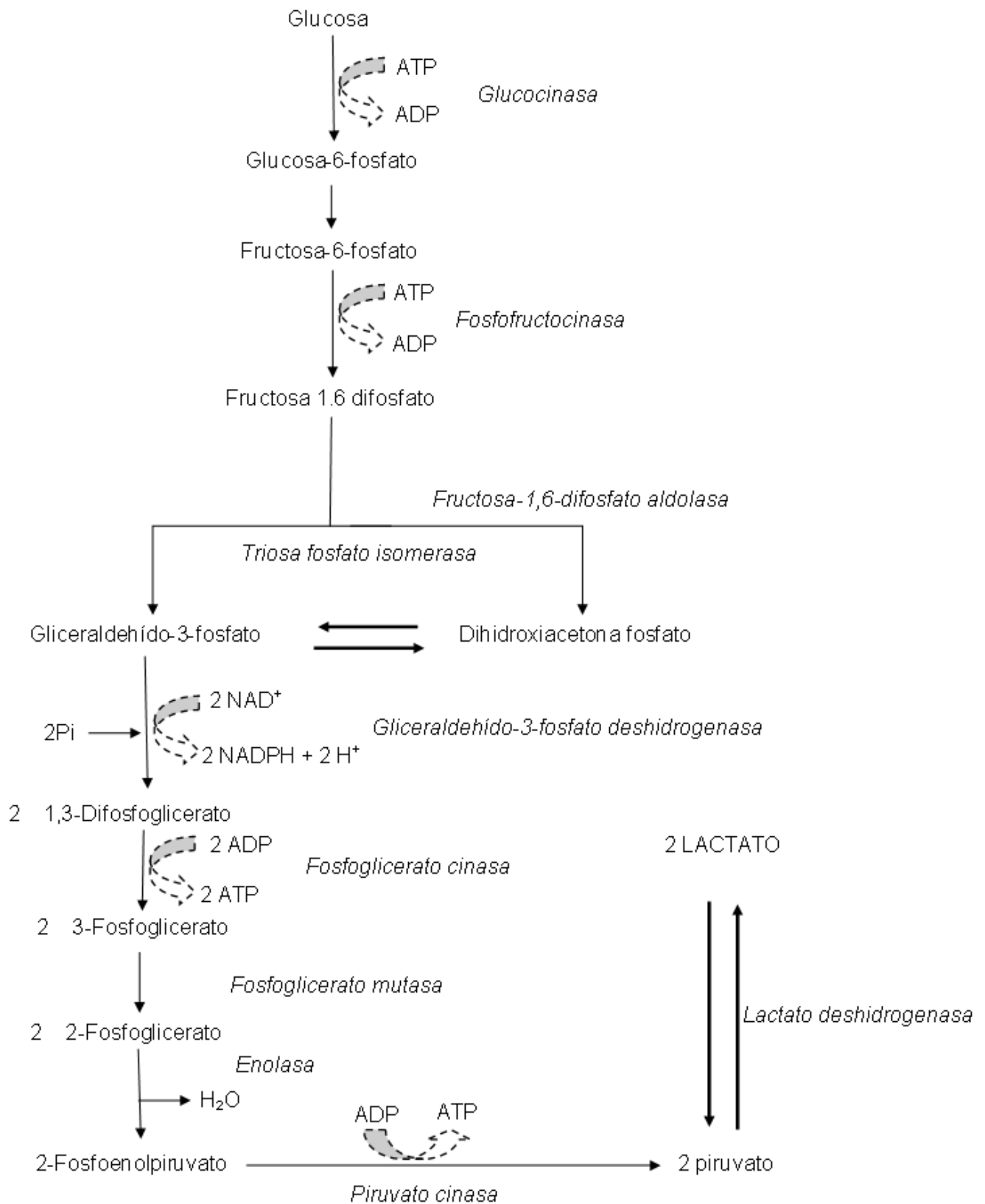


Figura 2. Vía homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas.

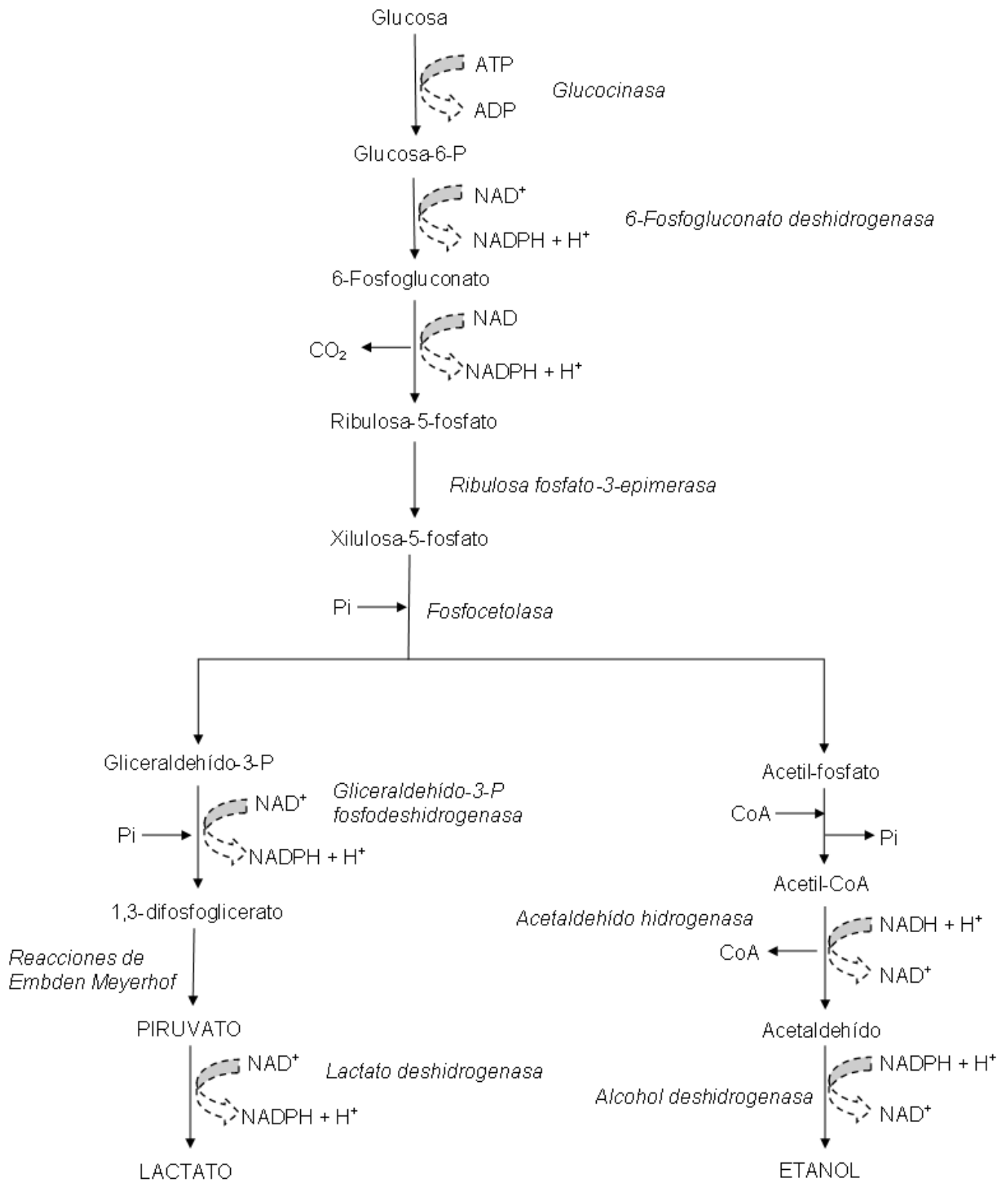


Figura 3. Vía heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Axelsson, 1993).

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas homofermentativas, heterofermentativas y heterofermentativas facultativas.

Homofermentativas		Heterofermentativas		Heterofermentativas facultativas
Lactobacillus <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. delbriekii</i> <i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. jugurti</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. leichmannii</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. salivarius</i>	Lactococcus <i>Lc. lactis subsp lactis biovar diacetylactis</i> <i>Lc. lactis subsp cremoris</i> <i>Lc. lactis subsp horniae</i> <i>Lc. garvieae</i> <i>Lc. plantarum</i> <i>Lc. raffinolactis</i>	Leuconostoc <i>L. cremoris</i> <i>L. dextranicum</i> <i>L. lactis</i> <i>L. gelidum</i> <i>L. carnosum</i> <i>L. argentinum</i> <i>L. citreum</i> <i>L. fallax</i>	Lactobacillus <i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. hilgardii</i> <i>Lb. trichoides</i>	Lactobacillus <i>Lb. acetotolerantes</i> <i>Lb. alimentarius</i> <i>Lb. agilis</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. coryniformis</i> <i>Lb. curvatus</i> <i>Lb. hamsteri</i> <i>Lb. paracasei</i> <i>Lb. pentosus</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. sake</i>
Pediococcus <i>P. acidilactici</i> <i>P. cerevisiae</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i> <i>P. parvulus</i>	Streptococcus <i>S. boris</i> <i>S. thermophilus</i>	Weissella <i>W. confusa</i> <i>W. hellenica</i> <i>W. kandleri</i> <i>W. minor</i> <i>W. viridescens</i>	Carnobacterium <i>C. divergens</i> <i>C. mobile</i> <i>C. gallinarum</i> <i>C. psicola</i>	Pediococcus <i>P. acidilactici</i> <i>P. pentosaceus</i> <i>P. damnosus</i> <i>P. dextrinicus</i> <i>P. inopinatus</i>
Tetragenococcus <i>T. halophilus</i> <i>T. muriaticus</i>		Oenococcus <i>O. oeni</i>	Vagococcus <i>V. fluviales</i>	

(Jay, 2000; Stiles y Holzapfel, 1997).

3.2.3 Clasificación y géneros representativos.

Los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus* y *Weissella*, son los que tienen mayor relevancia en la microbiología de los alimentos (Ramírez *et al.*, 2011; Wood y Holzapfel, 1995).

Lactobacillus. Bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos, incluyen cerca de 50 especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas

obligadas, son microaerófilos; el desarrollo superficial generalmente mejora ante baja tensión de oxígeno (5-10%) y es común la producción de bacteriocinas.

Ocasionalmente los *Lactobacillus* forman pigmento amarillo, rosa o rojo ladrillo, y los límites de temperatura para que se desarrollen es de 2 a 58°C con óptima de 30 a 40°C, se aíslan fácilmente de productos cárnicos, lácteos y de pescados, aguas, frutas, verduras y ensilados. Adicionalmente, se encuentran en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos.

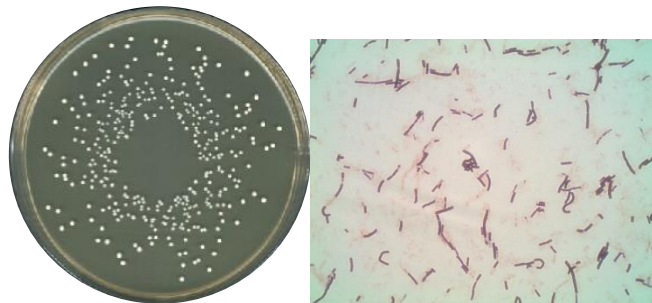


Figura 4. *Lactobacillus acidophilus*.

Streptococcus. Cocos de 0.8-1.2 μm , forman cadenas con más de 50 células, anaerobios facultativos, especies comensales del hombre y animales en mucosas (boca, tracto alimenticio, urinario y respiratorio). Se conforman por 39 especies, de las cuales tienen interés las especies *Streptococcus pyogenes*, con intensa actividad beta-hemolítica, como patógeno transmitido por los alimentos a partir de fuentes humanas y *Streptococcus agalactiae* de fuentes animales primariamente.

La especie *Streptococcus thermophilus* es un termófilo, con cepas específicas que se utiliza en la fermentación de productos lácteos, sobre todo combinado simbióticamente con otras BAL. Por ejemplo, el *Lactobacillus bulgaricus* estimula el estreptococo liberando aminoácidos mientras que forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueven el desarrollo del lactobacilo, lo cual se conoce como protooperación, propiedad aprovechada en la elaboración de yogurt.



Figura 5. *Streptococcus thermophilus*.

Carnobacterium. Este género se originó del *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas en cepas aisladas de carnes empacadas. Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 μm ; en cultivos viejos se alargan y tienden a perder la tinción Gram positiva, son psicrótofos y de metabolismo predominante homofermentativo, menos exigentes en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno.

Se aísla de la carne y productos cárnicos, pescado y agua de mar, producen bacteriocinas, pueden diferenciarse de *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a pH de 9.0, no crecen a pH 4.5, ni en agar acetato a pH de 5.4 y no se reproducen a 45°C.

Pediococcus. Cocos de 1.0-2.0 μm , se dividen alternativamente en dos planos perpendiculares dando lugar a la formación de tétradas, raramente se observan células aisladas, son anaerobios facultativos; las cepas se inhiben en presencia de oxígeno, son homofermentativas, algunas cepas son productoras de bacteriocinas, se utilizan como cultivos iniciadores de salchichas semiseca, deteriorador de cerveza y sidra, requieren medios complejos para desarrollarse, no son patógenos, pero con actividad descarboxilasa intensa de las que resultan aminas biogénicas, generalmente es intolerante al oxígeno primocultivo.

Lactococcus. Se puede reconocer como la bacteria láctica por excelencia de la leche, son las BAL más utilizadas como cultivos iniciadores en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches, consiste en células ovoides que aparecen aisladas, en pares o en cadenas, algunas cepas forman material gelatinoso que les rodea a manera de cápsula, son recuperables de leche cruda y algunas plantas.



Leuconostoc. Se obtiene de vegetales, productos cárnicos y lácteos, ensilados, vinos y productos fermentados, requieren medios complejos para desarrollarse, algunas especies son acidotolerantes, tienen temperatura óptima de crecimiento de 20 a 30°C, pH final en caldo glucosa 4.4 a 5.0, son heterofermentativas obligadas.

Están muy relacionadas con el género *Lactobacillus* cuyas formas cocoides y heterofermentadoras pueden confundirse con *Leuconostoc*. Involucradas en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero se utiliza en forma controlada en la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas agradables.

Su desarrollo es más lento que otras BAL, las cuales suelen desplazarlos en cultivos mixtos (Laurencio *et al.*, 2017; Stiles y Holzapel, 1997).

Vagococcus. Está relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* además de *Listeria*, *Streptococcus* y *Lactococcus*. Los *Streptococcus* aislados de pollo y agua fueron designados como *Vagococcus fluviales*. Una nueva especie de *Vagococcus salmoninarum* fue aislada de peces infectados con *Salmonella*.

Tetragenococcus. Especie incluida en el género *Enterococcus*. Para su crecimiento requiere NaCl concentración de 18%, esta más relacionada con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* que con *Lactobacillus*.

Weisella. Es un género nuevo que ha sido creado para incluir a un miembro del género *Leuconostoc* el cual es *Leuconostoc paramesenteroides*, de igual manera se incluye dentro de este género miembros heterofermentativos del género *Lactobacillus* como *Lactobacillus viridescens* y que ahora fue renombrado como *Weisella viridescens*.

3.2.4 Métodos de estudio clásicos.

Las BAL pueden detectarse en una diversidad de alimentos tanto crudos (frutas y verduras) como procesados (lácteos y cárnicos), madurados o no, su número es variable en los diferentes alimentos, la mayor parte de los estudios sobre BAL han sido realizados sobre todo con bacterias aisladas de leche o de productos lácteos (Leveau y Boix, 2000).

La identificación más ampliamente utilizada en las cepas a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas:

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10-15 y 45°C).
- Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (4.4 y 6.5%).
- Producción de NH₃ a partir de arginina.
- Fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trehalosa, xilosa, etc.).
- Producción de acetoína.
- Hidrólisis de esculina.
- Sobrevivencia al tratamiento térmico (63 y 65°C).

Para hacer la identificación de aquellas bacterias que se encuentran en poblaciones complejas, han surgido pruebas como los micrométodos que disminuyen costo y tiempo de realización de las mismas (Alvarado, *et al.*, 2007; Pereda *et al.*, 1990).

3.2.5 Características fermentativas de las bacterias ácido lácticas.

La fermentación de varios alimentos por las BAL es una de las formas más antiguas de bioconservación. Las bacterias antagonistas han sido reconocidas por siglos, pero en años recientes este fenómeno ha recibido más atención por los investigadores, debido a su potencial utilidad como sustancias naturales en la producción de alimentos para preservar la vida y la seguridad.

Actualmente los consumidores hacen conciencia de su salud, por lo que la dieta juega un rol muy importante en la prevención de las enfermedades y en la promoción de la salud. Por consiguiente, hay un incremento en la tendencia por los alimentos que contienen cultivos probióticos (Ramírez *et al.*, 2011; Soomro *et al.*, 2004).

Bacterias lácticas probióticas. Fuller en 1992, definió a los probióticos como “aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma benéficas al desarrollo de la flora microbiana en el intestino”.

Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las BAL, las cepas más utilizadas generalmente pertenecen a las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Amores *et al.*, 2004). En la **Tabla 2**, se muestra el uso de los probióticos y los efectos saludables que se les atribuyen.

Tabla 2. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud.

Microorganismo	Efecto beneficioso
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LC1	Equilibrio de la flora intestinal y efectos en el sistema inmunitario.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCF01748	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas, de diarreas y constipación.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarreas e inflamación del intestino.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>Lactobacillus casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos.
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Diarreas por rotavirus, equilibrio de la microbiota.
<i>Saccharomices boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis.

(Amores *et al.*, 2004).

En el mundo se reconocen más de 20 especies diferentes de microorganismos probióticos, los cuales pueden ser de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano y de animales, carnes, frutas y vegetales fermentados, entre otros (Alvarado *et al.*, 2007; Barboza *et al.*, 2004; Guililand, 1990).

La mayoría de estos microorganismos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticos y son utilizadas por la industria alimentaria para la elaboración de productos fermentados, predominando los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (Ogueke *et al.*, 2010; Barboza *et al.*, 2004) (**Tabla 3**).

Tabla 3. Microorganismos usados como probióticos.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>
<i>Lactobacillus casei subsp. rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>
<i>Lactobacillus delbriekii subsp. bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Streptococcus salivarius subsp. thermophilus</i>
<i>Lactobacillus boulaardii</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	<i>Lactococcus subsp. cremoris</i>

(Ramírez *et al.*, 2011).

Efectos benéficos de los probióticos.

El consumo de especies de probióticos ya sea a través de productos lácteos fermentados o como células vivas presentes en otros productos como los citados anteriormente, ha sido asociado con muchos beneficios para la salud en humanos. En la **Tabla 4**, se enlistan algunos efectos benéficos de las BAL contra enfermedades gastro intestinales, así como también en otras partes del organismo (Narayan *et al.*, 2010; Gupta y Garg, 2009; Farnworth, 2008; Ray, 1996).

Tabla 4. Beneficios en la salud de los consumidores atribuidos a los probióticos.

A: Para combatir:	Desarrollo de microflora nativa en el intestino. Control de infecciones en el intestino por patógenos entéricos. Control de infecciones en el tracto urogenital. Intolerancia a la lactosa
B: Para reducir:	Incidencia de diarreas Tumores de cáncer en colón (y otros órganos). Colesterol sérico y enfermedades cardíacas.
C: para estimular:	Sistema inmune. Movimiento intestinal.

(Ramírez *et al.*, 2011).

Mantenimiento de la flora intestinal y tratamiento de problemas digestivos. El consumo de productos lácteos fermentados y células vivas de BAL han sido sugeridos para controlar diferentes tipos de diarrea (viajero, crónica y pediátrica) en adultos y niños. Algunos de los productos comerciales disponibles para combatir la diarrea son:

productos lácteos fermentados como el yogurt conteniendo células vivas de *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y sus metabolitos, productos similares conteniendo células vivas y metabolitos de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri* y *Bifidobacterium*, la leche es pasteurizada e inoculada con las células vivas ($\leq 10^6$ /ml) (Ramírez et al., 2011; Bozoglu y Ray, 1996).

Las bacterias probióticas han sido usadas para restablecer la flora intestinal normal durante la terapia con antibióticos. Por ejemplo, fue reportado que la aplicación de una fórmula infantil suplementado con *Bifidobacterium bifidum* y *Streptococcus thermophilus* a infantes de edad de 5-24 meses, reduce la incidencia de diarrea aguda e incluso elimina el rotavirus que lo provoca (Ramírez et al., 2011; Saavedra et al., 1994). Por su parte, Elmer et al., en 1996, evidenciaron el uso de probióticos en el tratamiento de enfermedades diarreicas tratadas con antibióticos, habiendo encontrado resultados positivos en cuanto a la reducción de la diarrea y malestares estomacales.

En otro estudio Piper y Leyva en el 2009, demostraron la inhibición efectiva del crecimiento de cepas gastrointestinales de *Escherichia coli* por especies de *Lactobacillus*, también se ha demostrado que los probióticos en combinación con tratamientos médicos estándar podrían ser usados en el tratamiento de úlcera péptica causada por *Helicobacter pylori* y posiblemente en su profilaxis (Hamilton, 2003).

Asimismo, otros estudios recomiendan el suministro rutinario habitual de fibras y bacterias lácticas probióticas específicas tanto a pacientes que sufren pancreatitis aguda y poli trauma, así como también a aquellos que tienen tratamientos quirúrgicos extensivos o tratamientos médicos intensos (Bengmark y Gil, 2006).

Modulación del sistema inmunológico. Ciertos componentes celulares de las bacterias probióticas actúan como inmunomoduladores, es decir, que promueven el ataque inmunológico en contra de las células malignas. Diversos estudios han demostrado que los probióticos poseen la habilidad de activar los macrófagos y linfocitos mejorando los niveles de inmunoglobulina A (IgA) y producción de gama interferón (Reid et al., 2003). Esta activación del sistema inmune también contribuye hacia la resistencia del huésped a los patógenos. Por ejemplo, Yasui et al., en 1995,



demonstraron que, una cepa de *Bifidobacterium breve* YIT4064 aislada de heces de ratones, aumentó significativamente la protección contra rotavirus. Asimismo, se ha reportado que *Lactobacillus rhamnosus*, presenta efectos benéficos en la inmunidad intestinal al incrementar el número de IgA y otras inmunoglobulinas de células secretoras en la mucosa intestinal, además estimula la liberación de interferones (Gupta y Garg, 2009).

Reducción de cáncer de colón. En relación a la actividad anticancerígena ha sido evidenciado un efecto de las bifidobacterias sobre la modulación de la actividad enzimática de las poblaciones bacterianas del colón, las cuales a su vez podrían estar asociadas con enfermedades o promoción de tumores. Por ejemplo, la incidencia de cáncer de colón fue más baja cuando la población de bifidobacterias del colón fue más alta y la población de *Clostridium perfringens* fue más baja (Sanders, 2000).

En algunos estudios se ha demostrado que la administración de bifidobacterias o *Lactobacillus* a animales disminuyeron los tumores y los folículos aberrantes del colón, los cuales son supuestamente lesiones precancerosas (Barboza *et al.*, 2004; Sanders, 2000).

Por otra parte, estudios *in vitro* y moleculares del uso de probióticos han demostrado resultados alentadores, principalmente atribuidos a sus efectos antimicrobianos contra microorganismos carcinógenos, tienen propiedades antimutagénicas y alteración de los procesos de diferenciación celular en tumores (Liong, 2008).

También se ha reportado recientemente que los cambios en la dieta, incluyendo el consumo de probióticos, además constituyentes de los alimentos poco digeribles o indigeribles, tales como oligosacáridos (prebióticos) y polifenoles, o ambos (simbióticos), son reconocidos como modificadores del número y tipos de microbios en el tracto digestivo y han sido recomendados para aumentar el sistema inmunológico y reducir el riesgo de cáncer de colón (Le Leu *et al.*, 2010; Davis y Milner, 2009).

Usos en intolerancia a la lactosa. Un área donde hay buena evidencia del efecto benéfico de los probióticos es la habilidad de las leches fermentadas para aliviar la condición conocida como intolerancia a la lactosa; la cual se presenta en personas cuyo intestino delgado no produce suficiente enzima lactasa (Barboza *et al.*, 2004;

Sanders, 2000). Los pacientes con intolerancia a la lactosa sufren de diarrea o dolores abdominales y presentan flatulencias excesivas después de ingerir leche. Sin embargo, cuando los pacientes toman leches fermentadas, tales como yogurt, los efectos adversos por la intolerancia a la lactosa son menos severos o ausentes (Ogueke *et al.*, 2010). Lo anterior es debido, según Sanders (2000) y Adams y Moss (1999), a la presencia de β -galactosidasa, en organismos vivos son iniciadores como probióticos.

Al respecto, en un ensayo *in vitro* se demostró la desaparición de la lactosa debido a la actividad de lactasa real de *Bifidobacterium bifidum* (Manzano *et al.*, 2012; Passerat y Desmaison, 1995). También han sido estudiados pacientes intolerantes a la lactosa para evaluar los efectos del consumo de leche contenido en diferentes cepas de *Bifidobacterium longum* sobre la digestión de la lactosa (Labayen y Martínez, 2003; Jiang *et al.*, 1996).

Los autores demostraron que las leches que contienen *Bifidobacterium longum* pueden reducir los síntomas de mal absorción de la lactosa, mejorando su velocidad de consumo.

Disminución de colesterol sérico. Elevados niveles de colesterol en la dieta y sanguíneo son considerados un factor de riesgo principal para enfermedades coronarias del corazón. En este sentido se han realizado ensayos en los que se menciona una disminución del colesterol en suero sanguíneo durante el consumo muy grande de productos lácteos fermentados (Barboza *et al.*, 2004). Los mecanismos y el efecto de las bacterias probióticas en la reducción del colesterol sérico se desconocen. Una de las hipótesis sugiere que ciertas cepas de *Lactobacillus acidophilus* tienen la capacidad de asimilar el colesterol de un medio de cultivo en condiciones anaerobias (simulando la situación en el contenido intestinal) (Díaz *et al.*, 2012; Guilliland *et al.*, 1995). Otro mecanismo propuesto se basa en la capacidad de ciertas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para desconjugar los ácidos biliares, se atribuye a la actividad 7- α -hidroxilasa bacteriana. El eventual aumento de las pérdidas fecales de ácidos biliares conduciría a un aumento compensatorio de su



síntesis hepática a partir del colesterol, reduciendo así la colesterolemia. (Ros, 2000; Thari *et al.*, 1995; Klaver y Van der Meer, 1993).

En la industria alimentaria los probióticos son utilizados en la elaboración de los llamados “alimentos probióticos” siendo aquellos a los que se les han adicionado microorganismos que benefician la salud del huésped manteniendo un equilibrio en la flora intestinal. Existe una gran variedad de presentaciones de productos probióticos en el mercado, tales como leches fermentadas, siendo el yogurt y quesos los más usuales, sin embargo existen en carnes, vegetales encurtidos, etc.

También pueden ser presentados en forma de tabletas, cápsulas, polvos o sobres con bacterias liofilizadas o deshidratadas. Asimismo, los probióticos pueden ser encontrados en forma de suplemento y como componentes de alimentos y bebidas (Ogueke *et al.*, 2010; Barboza *et al.*, 2004), por los efectos benéficos a la salud que confieren.

Leches fermentadas.

La fermentación de la leche para la elaboración de diversos productos fermentados es una práctica muy antigua, lo cual seguramente se originó la intención durante el almacenamiento del alimento. Las leches fermentadas son productos preparados a partir de la leche entera, parcial o totalmente descremada, concentrada o bien sustituida, total o parcialmente con leche descremada en polvo, pasteurizada o esterilizada y fermentada por medio de microorganismos específicos, siendo los principales las BAL (Jay, 2000; García *et al.*, 1998).

Existe una variedad muy amplia de leches fermentadas (**Figura 6 y Tabla 5**), en los que intervienen un gran número de especies de BAL y algunas levaduras. Sin embargo, el yogurt es el más ampliamente difundido en el mundo. En algunos países el consumo de estos productos es superior al de leche fresca, y se utilizan leches de diferentes especies; por ejemplo la vaca, oveja, cabra, camella, y yegua (Ramírez *et al.*, 2011; García *et al.*, 1998).

En ocasiones es difícil definir algunos de esos productos debido a su gran número y a que se elaboran de diferentes formas y con distintos tipos de materia prima; este puede ser el caso del *buttermilk*, o en México el “jocoque”.

También es difícil tener una clasificación de estos productos debido a que sus características pueden variar de un fabricante a otro, e incluso, particularmente en el caso de las leches fermentadas tradicionales, los microorganismos que intervienen en su elaboración pueden variar de acuerdo con la región, el procedimiento de inoculación y aún de las variaciones climáticas.

En México el yogurt se elabora industrialmente, siendo por muchas razones la leche fermentada más ampliamente difundido, el Yakult, el jocoque (que es equivalente a *buttermilk* elaborado en Estados Unidos), y en menor proporción el labne o jocoque árabe (Moreno *et al.*, 2013; García *et al.*, 1998; Shirai *et al.*, 1996).



Figura 6. Productos fermentados.

Existe también en muchos hogares la costumbre de elaborar leches fermentadas a nivel casero, como son el yogurt, el labne y sobre todo un producto denominado “búlgaros” que en esencia se trata del kéfir. La transformación de la leche en estos alimentos fermentados representa varias ventajas.

Tabla 5. Bacterias ácido lácticas utilizadas en la elaboración de productos lácteos.

Productos	Bacterias principales	Usos
Yogurt	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus thermophilus</i>	Proveen sabor, gusto suave y delicado y promueven la cuajada, mejoran la digestión, absorción, contribuyen a promover la salud.
Bebidas fermentadas a base de leche	<i>Streptococcus lactis</i> <i>Streptococcus cremoris</i> <i>Lactobacillus herveticus</i>	Adicionan sabor, contribuyen a promover la salud.
Quesos	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueven el cuajado, proveen aroma y sabor.
Mantequilla madura	<i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Streptococcus diacetylactis</i>	Promueven moderando sabor agrio y aroma.
Crema ácida	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Leuconostoc cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis subsp. diacetylactis</i>	Promueven sabor característico (pequeñas cantidades de acetaldehído y grandes cantidades de diacetilo).
Yakult	<i>Lactobacillus casei</i>	Promueven moderando sabor agrio y aroma. Contribuyen a promover la salud.

(Ramírez *et al.*, 2011).

Además del uso de las BAL en la elaboración de leches fermentadas y diversas variedades de queso; siendo estas las aplicaciones principales, dicho tipo de microorganismos también son utilizados en el procedimiento de carnes, bebidas alcohólicas y vegetales para obtener productos tales como salchichas, jamones curados, vinos, cerveza, licores fortificados, aceitunas, encurtidos y col agria, entre otros (**Tabla 6**).

Tabla 6. Usos de las principales bacterias ácido lácticas en alimentos.

Género	Principales especies y aplicaciones
<i>Streptococcus</i>	<i>S. lactis</i> , <i>S. cremoris</i> , usos en mantequilla, queso y yogurt. <i>S. thermophilus</i> , uso en yogurt y queso.
<i>Pediococcus</i>	<i>P. cerevisiae</i> cerveza, uso en carne procesada. <i>P. halophilus</i> , uso en salsa de soya.
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. mesenteroides</i> , <i>L. citrovorum</i> , usos en alimentos fermentados y producción de dextrán.
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. bulgaricus</i> , yogurt, usos en bebidas fermentadas a base de leche. <i>L. helveticus</i> , uso en queso, yogurt y bebidas a base de leche fermentada. <i>L. acidophilus</i> , uso en yogurt y bebidas a base de leche fermentada. <i>L. plantarum</i> , uso en diversos alimentos fermentados y ensilajes. <i>L. fermenti</i> , <i>L. brevis</i> , usos en productos fermentados.
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. bifidum</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. adolescents</i> , usos en leche fermentada, preparación de bacterias lácticas, el intestino de infantes y adultos. <i>B. thermophilum</i> , <i>B. pseudolongum</i> , usos en el intestino de animales.

(Barboza *et al.*, 2004).

3.2.6 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL.

El alto interés que despierta el estudio y la identificación de las BAL en los alimentos se debe al importante papel que desempeñan en la industria de los alimentos por su reconocida capacidad fermentativa, así como por sus beneficios para la salud humana.

Actualmente el interés en el estudio de las BAL se debe a su efecto antagonista contra microorganismos patógenos que contaminan a los alimentos, el cual es atribuido a algunas de sus características bioquímicas (**Tabla 7**).

La mayoría de estas bacterias pueden convertir los carbohidratos en ácidos orgánicos, ácido láctico o ácido acético. El H₂O₂ que es producido por las BAL en condiciones microaerofilias, el cual puede tener efecto inhibitorio sobre diversos microorganismos así como diacetilo y el CO₂, también participan en el efecto antagonista de las bacteriocinas de algunas BAL que son punto de interés a considerar para explicar la actividad antagonista de las BAL (Turgay *et al.*, 2002).

Otro punto importante que opera es el proceso de la competencia por los nutrientes disponibles en el medio, con notable participación en el efecto antagónico.

Tabla 7. Compuestos inhibitorios producidos por BAL y su mecanismo de acción.

Componente inhibitorio	Mecanismo de acción
Bacteriocinas	Ruptura de la membrana citoplasmática.
Ácido láctico	Ruptura del metabolismo celular.
Peróxido de hidrógeno	Inactivación de biomoléculas esenciales por el anión superóxido de la reacción de la cadena, activación del sistema lactoperoxidasa.
Dióxido de carbono	Ambiente anaerobio y/o inhibición de enzima, descarboxilación y/o ruptura de la membrana celular.
Diacetilo	Interfiere en la utilización de arginina.

(Turgay *et al.*, 2002).

Bacterocinas. Son péptidos antimicrobianos heterogéneos, con diferentes niveles y espectros de actividad, mecanismos de acción, peso molecular y propiedades fisicoquímicas (Stoyanova *et al.*, 2012). Éstas pueden ser sintetizadas por bacterias Gram positivas y Gram negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005); sin embargo, las que son producidas por las BAL han sido de gran interés por la industria alimentaria debido a las siguientes razones: se encuentran fácilmente en BAL comerciales (lactococos, lactobacilos y pediococos), son consideradas seguras para su consumo, no son tóxicas para las células eucariotas y presentan un espectro de inhibición más amplio en comparación con los espectros de las Bacteriocinas sintetizadas por bacterias Gram negativas (Nes *et al.*, 2007). De acuerdo con Chen y Hoover (2003) las bacteriocinas son metabolitos secundarios de las BAL, se definen como productos de la síntesis ribosómica, conformado por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (lactococinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J, entre otras). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida sobre microorganismos patógenos y responsables la degradación de alimentos. Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter *et al.*, 2005).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida. Entre sus características principales destacan el ser estables al calor y a pH ácidos, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (Chen y Hoover, 2003), sin embargo, aunque las bacteriocinas presentan estabilidad a pH ácido, son destruidas a pH mayor a 10. La alta termorresistencia en las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa, les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche, pero son parcialmente destruidas por arriba de los 100°C. Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006).

Debido a su naturaleza proteica, las bacteriocinas son inactivadas por proteasas, incluyendo las de origen pancreático y gástrico, debido a ello durante su paso por el tracto gastrointestinal son inactivadas, sin ser absorbidas como compuestos activos (Quintero, 2006), resultando así presuntamente inocuas para el consumidor. Las bacteriocinas presentan un amplio espectro antimicrobiano, siendo activas a bajas concentraciones (menores a 10 ppm) frente a bacterias Gram positivas patógenas o deteriorativas de alimentos, se ha demostrado que dicha actividad también se extiende a bacterias Gram negativas sub-letalmente dañadas por los tratamientos térmicos o por la presencia de agentes quelantes. Estudios comparativos demuestran que presentan mayor inhibición contra las bacterias Gram positivas, las bacteriocinas presentan inhibición contra patógenos como *Clostridium botulinum*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Escherichia coli* y algunas especies de *Bacillus* (Jeevaratnam *et al.*, 2005; Wu *et al.*, 2004).

Clasificación. Las bacteriocinas se clasifican en 3 grupos:

Clase I. Lantibióticos.

Los lantibióticos son péptidos pequeños conformados por 19-38 aminoácidos (Montalbán *et al.*, 2011; Savadogo *et al.*, 2006), policíclicos, con un peso molecular menor a 5 kDa, con poca estabilidad al calor y son modificados postraduccionalmente

(cambio químico ocurrido en las proteínas después de su síntesis proteica) por la deshidratación de la serina y la treonina formando aminoácidos como dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb), estos residuos, pueden unirse a través de un grupo tioéter a cadenas laterales de cisteína dando lugar a los aminoácidos inusuales como lantionina (Lan) y α -metil-lantionina (MeLan) (Riley y Wertz, 2002), los lantibióticos son los únicos que se producen en el ribosoma como un pre péptido, que experimenta una modificación postraducciona extensa para formar un péptido activo (McAuliffe *et al.*, 2001).

Los lantibióticos son subdivididos en dos grupos, de acuerdo a sus características estructurales y a su modo de acción contra microorganismos (Gauder *et al.*, 2000):

Clase Ia. Son péptidos elongados en forma de tornillos con moléculas anfipáticas, presentan un peso molecular menor a 4 kDa, flexibles, con carga neta positiva, cuya actividad antimicrobiana se debe a la destrucción de la célula por la despolarización de la membrana citoplasmática (Stoyanova *et al.*, 2012; Chen y Hoover, 2003). La bacteriocina mas representativa es la nisina (Cintas *et al.*, 2001).

Clase Ib. Son péptidos globulares e hidrófobos, con un peso molecular entre 1.8 y 2.1 kDa, presentan una carga neta negativa o sin carga, su actividad antimicrobiana esta relacionada principalmente con la inhibición enzimática (Riley y Wertz, 2002). Bacteriocinas como duramicina A, B, C y la cinamisina son representativas de este grupo (Naidu *et al.*, 2006).

Clase II. No lantibióticos. Los no lantibióticos están conformados por bacteriocinas constituidas por 30 a 60 aminoácidos (Montalbán, 2011), con un peso molecular menor a 10 kDa, no contienen aminoácidos modificados y son estables al calor y al pH (Beshkova y Frengova, 2012). Este grupo de bacteriocinas es considerado como el mayor subgrupo de bacteriocinas provenientes de las BAL, no sólo por su gran número, sino también por su actividad antimicrobiana y aplicaciones potenciales.

Los no-lantibióticos son subdivididos en tres grupos:

Clase IIa. Este grupo se caracteriza por contar con una secuencia amino terminal Tirosina-Glicina-Asparagina-Glicina-Valina-Xaa-Cisteína (Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys; donde Xaa indica cualquier residuo de aminoácido) y contiene uno o dos puentes disulfuro (Chen y Hoover, 2003), este grupo es reconocido principalmente por su alta actividad antimicrobiana contra *Listeria* (Zouhir *et al.*, 2010). Solo tres bacteriocinas de este grupo han sido caracterizadas: pediocina PA-1, enterocina A y divercina V41 (Chen y Hoover, 2003).

Clase IIb. Este grupo esta conformado por bacteriocinas con dos péptidos y la actividad antimicrobiana requiere de la presencia de ambos péptidos en proporciones similares (Oppegard *et al.*, 2007), son formadores de poros en la membrana celular. La sakacina es la bacteriocina más representativa de este grupo (Cintas *et al.*, 2001).

Clase IIc. Poseen una estructura cíclica como resultado de la unión covalente de sus extremos carboxilo y amino terminal, son termoestables y no modificados después de la traducción (Šuškovič *et al.*, 2010), éstos carecen de la secuencia (Try-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys) que contienen la clase IIa y IIb. La enterocina AS-48 producida por *Enterococcus faecalis* es la bacteriocina más representativa de este grupo (Dimov *et al.*, 2005).

Clase III. Termolábiles. Este grupo es denominado “bacteriolisinas”, incluye péptidos con un peso molecular mayor a 30 kDa y son lábiles al calor (Abriouel *et al.*, 2011), su mecanismo de acción se realiza a través de las células sensibles; las bacteriolisinas más representativas son la helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus* y la enterocina producida por *Enterococcus faecium* (Naudi *et al.*, 2006).

Mecanismo de acción de las Bacteriocinas. De acuerdo con Cintas *et al.*, (2001) se ha determinado que las bacteriocinas demuestran alta actividad bactericida que se relaciona principalmente con el contenido de cistina; de acuerdo a ello, se establecen los tres espectros de acción:

- I. Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie.

- II. Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram positivas y patógenos presentes en alimentos.
- III. Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram positivas.

Cotter *et al.*, en el 2005, determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (**Figura 7**).

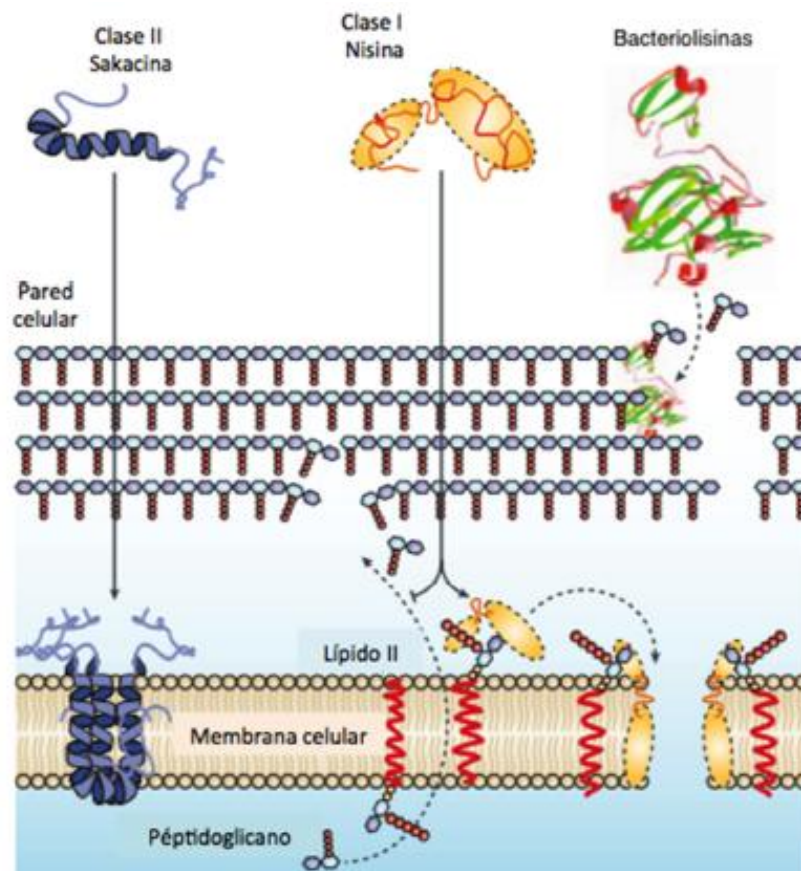


Figura 7. Modo de acción de los lantibióticos (Clase I), no-lantibióticos (Clase II) y bacteriolisinas (Clase III) (Adaptado por Cotter *et al.*, 2005).

El modo de acción de los lantibióticos se atribuye a la destabilización (debido a la formación de poros) de las funciones de la membrana citoplásmica, la estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que pueden atravesar la membrana formando poros



(Chen y Hoover, 2003). El lado apolar de la molécula se situó próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro, como consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP y en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas, la pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular (McAuliffe *et al.*, 2001).

Algunos miembros de la clase I, como la nisina, han demostrado un modo de acción dual, la nisina se une a la pared celular mediante atracciones electrostáticas, lo cual se facilita debido a la carga positiva de este péptido y las cargas negativas de los componentes de la pared celular, posteriormente, la nisina se une al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto previene la síntesis correcta de la pared celular, provocando la formación de un poro transmembranal permitiendo la salida de aminoácidos y ATP, lo que conduce a la muerte celular (Hassan *et al.*, 2012; Cotter *et al.*, 2005).

Los no-lantibióticos contienen dos péptidos en su estructura principal, los cuales pueden presentar actividades duales distribuidas a través de sus dos péptidos (Ennahar *et al.*, 2000), en general, los péptidos de esta clase tienen una estructura anfifílica helioidal, lo que les permite orientarse e insertarse en la membrana de la célula, provocando la muerte celular. El modo de acción principal se debe a las interacciones con la membrana celular, se inicia con el reconocimiento entre la bacteriocina y el receptor de la membrana celular, seguido de una serie de interacciones electrostáticas, que le permite insertarse dentro de la membrana interfiriendo con su estructura y conduciendo a una despolarización y muerte (Hu *et al.*, 2006).

El mecanismo de acción de las bacteriocinas de la clase III “bacteriolisinas” es menos complejo con respecto a los lantibióticos y los no-lantibióticos, ya que actúan directamente sobre la pared celular de las bacterias Gram positivas lo que conduce a la muerte y lisis de la célula (Cotter *et al.*, 2005).

En la **Tabla 8** se menciona los principales microorganismos productores de las bacteriocinas y en la **Tabla 9** los microorganismos sensibles a las bacteriocinas.

Tabla 8. Bacteriocinas y microorganismos productores.

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus</i>

(González *et al.*, 2003).

Tabla 9. Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismos sensibles.

Organismo productor	Bacteriocina	Microorganismos sensibles
<i>Lactococcus cremoris</i>	Lactoestrepcina 5	<i>Lactococcus lactis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Lactacina Lactacina B	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium subsp.</i> <i>Lactobacilli</i>
<i>Lactobacillus subsp.</i>	Sin nombre	<i>Clostridium</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Lactobacillus saké</i>	Sakacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>

Tabla 9. Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismos sensibles (continuación).

Organismo productor	Bacteriocina	Microorganismos sensibles
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Bulgaricina	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas subsp.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Lactococcus lactis</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i>
<i>Pediococcus acidolactici</i>	Pediocina AcH	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium perfringes</i>
	Pediocina PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocina A	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i>

Ácidos orgánicos.

Ácido láctico. El ácido láctico es un compuesto incoloro, viscoso y no volátil, su masa molecular es 90.08 g/mol y su fórmula $\text{CH}_3\text{CHOCOOH}$, se da bajo forma ópticamente activa, dextrógira y levógira, frecuentemente denominada ácido D-Láctico y ácido L-Láctico siendo esta forma que presenta el mayor efecto inhibitorio, es producido naturalmente durante la fermentación de los alimentos por las BAL, incluyendo los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Carnobacterium* (Ardila, 2014; Ouwehand, 1993).

El ácido láctico es probablemente uno de los agentes antimicrobianos más antiguos, inhibe a *Clostridium* de las especies *C. botulinum*, *C. perfringes*, *C. sporogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* (Juneja y Sofos, 2002).

Ácido acético. El ácido acético, cuya fórmula CH_3COOH , es otro ácido orgánico, producido por las BAL. El ácido acético y sus sales presentan su actividad antimicrobiana a pH 4.5 y el efecto se debe a la disociación de moléculas, además, son generalmente reconocidos como seguros por la FDA en los Estados Unidos.

En contraste con la mayoría de los ácidos orgánicos, el ácido acético es generalmente más efectivo contra levaduras y bacterias. Las bacterias que inhibe, incluyen los géneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella*.

Juneja y Sofos en el 2002, reportan que una concentración de ácido acético al 0.1% es bacteriostático para *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* de las especies *S. enteritidis* y *S. typhimurium*, *Aeromonas hydrophila*, no se mostró el mismo efecto con cepas de *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* entre otros (Ardila, 2014; Ouwehand, 1993).

Otros compuestos.

El *peróxido de hidrógeno* es uno de los compuestos con actividad antimicrobiana, que pudieran estar produciendo las BAL, sin embargo, la presencia de este metabolito no es deseable en algunos alimentos debido a que es una sustancia oxidante que puede ocasionar decoloraciones, sabores desagradables o degradación de nutrientes, muchas bacterias fermentadoras producen peróxido de hidrógeno como un mecanismo protector contra el oxígeno, el peróxido de hidrógeno producido por las BAL es inhibidor de bacterias, Gram negativas como *Pseudomonas subsp.* y Gram positivas como *Staphylococcus aureus*.

El H_2O_2 aumenta en el medio circulante mientras se tengan condiciones anaerobias, el efecto letal del H_2O_2 puede deberse a la inactivación de biomoléculas esenciales por el ión superóxido de la reacción en cadena, también puede funcionar por la vía del sistema de la lactoperoxidasa-tiocianato, el H_2O_2 oxida el tiocianato para producir compuestos tóxicos en la oxidación, productos que son letales para los patógenos en los alimentos, el H_2O_2 es más efectivo como esporicida que bactericida (Milena *et al.*, 2009; Charumati y Lambert, 1996).

Lactobacillus (algunas especies), *Lactococcus lactis* y *Leuconostoc cremoris* pueden producir H_2O_2 cuando se transfieren de condiciones anaerobias a aerobias, se ha demostrado que este metabolito inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, varios microorganismos psicrótofos y *Pseudomonas subsp.* (González *et al.*, 2004).



El *dióxido de carbono* puede ejercer efecto antimicrobiano de varias maneras en un medio ambiente más anaeróbico por inhibición enzimática, descarboxilación y por ruptura de la membrana celular con acumulación de gases en la fase de la biocapa lipídica (Téllez, 2017; Charumati y Lambert, 1996).

El *diacetilo* (2,3 butanodiol) es sintetizado por ciertas especies de BAL a partir del piruvato, este inhibe el crecimiento de diversas bacterias Gram negativas, Gram positivas y levaduras, produce el sabor a mantequilla en productos fermentados y en algunos alimentos es usado como aditivo, el diacetilo interfiere con la utilización de la arginina, por reacción con la arginina ligada a proteínas de organismos Gram negativos (Parada, 2017; Jay, 2000; Charumati y Lambert, 1996).

Jay en el 2000, reportó que 200 µg/mL de diacetilo inhiben levaduras y bacterias Gram negativas y 300 µg/mL contra *Listeria* de las especies *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *Salmonella anatum* y *S. typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* y *Aeromonas hydrophila*, el diacetilo solo fue efectivo contra bacterias Gram negativas mostrando una disminución de células viables después de 24 h de incubación a 4°C, el diacetilo juega un rol importante en la preservación natural de los alimentos.

Ácidos grasos. Algunos *Lactobacillus* y *Lactococcus* muestran actividad lipolítica y bajo ciertas condiciones producen concentraciones significativas de ácidos grasos, los cuales muestran actividad antimicrobiana, en muchos casos los ácidos grasos mejoran las características sensoriales de los alimentos fermentados (Parada, 2017; Wood y Holzapfel, 1995).

Bacteriocinas y su uso potencial en alimentos.

Las bacteriocinas son una opción atractiva como conservadores naturales para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados, actualmente, se ha demostrado que presentan un alto potencial en la biopreservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales fermentados, entre otros, ya sea solos o en combinación con



otros métodos. De acuerdo con lo propuesto por Cleveland *et al.*, (2001), las bacteriocinas pueden ser utilizadas en los alimentos de las siguientes maneras:

- a) Como cultivos iniciadores de alimentos fermentados.
- b) Adicionadas directamente al producto purificadas o semipurificadas.
- c) Como un ingrediente en la elaboración de alimentos (aditivos).

Sin embargo, las bacteriocinas deben cumplir con importantes criterios de regulación para su aplicación en los alimentos (Gautam y Sharma, 2009) describiéndose a continuación:

- La cepa productora debe estar dentro de la clasificación GRAS, es decir, no estar asociada con proveer algún riesgo a la salud.
- Deben ser reconocidas y aceptadas para su uso en alimentos por una autoridad reguladora.
- Deben cumplir con un espectro de inhibición que puede incluir microorganismos patógenos o tener actividad contra uno en particular.
- Su adición en los productos debe presentar efectos benéficos, tales como mejorar la seguridad, calidad y/o sabor.
- Alta actividad antimicrobiana a bajas concentraciones.

Entre aplicaciones más importantes de las bacteriocinas en alimentos, se encuentran los siguientes:

- En los productos enlatados como en granos de elote, chícharos, papas, hongos y zanahoria se aplican para controlar el crecimiento de termófilos esporulados (Delves, 2005).
- El uso de las bacteriocinas en los productos del mar es muy complejo, debido a su constitución del producto (matriz baja en azúcares), por lo tanto, la bacteriocina que se adicione, no debe ocasionar un deterioro en el producto, por la baja acidificación que está puede proveer (Piet y Leroi, 2011).
- En productos cárnicos se utilizan para inhibir *Clostridium botulium*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* (Naidu *et al.*, 2006). También se busca reducir el uso de los nitritos y sus derivados que pueden formar nitrosaminas cancerígenas.

- En el vino y cerveza, el objetivo principal es inhibir levaduras, el crecimiento de lactobacilos y pediococos como microorganismos deteriorativos, las bacteriocinas son adicionadas en los vinos para prevenir el crecimiento de las BAL y asegurar la ausencia de la fermentación maloláctica, evitando la disminución del pH del producto que causa defectos como la mucosidad y el exceso de acetato, que promueven un efecto negativo en la calidad del vino. En la cerveza, inhiben el crecimiento de lactobacilos y pediococos que conducen a una cerveza con exceso de acidez y sabores extraños, debido a la producción de diacetilo (Naidu *et al.*, 2006).
- En productos lácteos, es más común el uso de bacteriocinas. En los quesos, las bacteriocinas controlan el crecimiento de las BAL ya que un exceso de ellas proveerá de sabores extraños a los productos, por otro lado su aplicación promueve la aceleración de su maduración (Beshkova y Frengova, 2012). En la leche, previene la esporulación de bacterias termofílicas resistentes al calor que pueden sobrevivir a la pasteurización (Ekbal *et al.*, 2012).

Tabla 10. Bacteriocinas de uso potencial aplicadas en los alimentos.

BAL	Bacteriocina	Microorganismo susceptible	Alimento	Referencia
<i>Enterococcus durans</i> 41D	Duracina GL	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A	Queso artesanal	Du <i>et al.</i> , 2011
<i>Lactobacillus curvatu</i>	Curvaticina FS47	<i>L. monocytogenes</i>	Carne molida	Naudi <i>et al.</i> , 2006
<i>Enterococcus faecalis</i>	Enterocina AS-48	<i>L. monocytogenes</i>	Jugo de lechuga	Settani y Corsetti, 2008
		<i>Bacillus cereus</i>	Purés y sopas de vegetales	Grande <i>et al.</i> , 2007
	Enterocina A y B	<i>Listeria innocua</i> CTC1014	Salchichas	Aymerich <i>et al.</i> , 2000
	Enterocina 226 NWC	<i>L. monocytogenes</i>	Queso mozzarella	Vaillani <i>et al.</i> , 1993
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina Sakacina P	<i>L. monocytogenes</i>	Carne Pollo refrigerado	Katla <i>et al.</i> , 2002

4. Justificación.

Las enfermedades crónicas no transmisibles tales como, DM2 y el SM, se han incrementado de forma alarmante, no solo en la República Mexicana, sino en todo el mundo y representan un grave problema de salud (OPS/OMS, 2018), siendo asociadas con elevadas tasas de morbilidad y mortalidad. En caso de no tomarse medidas adecuadas, no habrá presupuesto que sea suficiente para mitigar el impacto sufrido por éste tipo de patologías (IMCO, 2012).

Dentro de los factores de riesgo que favorecen el desarrollo de DM2 se encuentran: la predisposición genética, el sobrepeso, la obesidad, la falta de ejercicio y una dieta no balanceada y carente de prebióticos y probióticos. Los Probióticos, de acuerdo a la OMS son "*microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un efecto benéfico a la salud del huésped*" (FAO /OMS, 2002); así mismo, ha sido reportado que el consumo de éste tipo de microorganismo puede contrarrestar los daños producidos por éste tipo de patologías. En caso de que los gorgojos llegaran a ser portadores de bacterias ácidos lácticos, estos podrían ser un excelente fuente potencial para el desarrollo y formulación de nuevos alimentos nutracéuticos para el tratamiento de enfermedades derivadas del síndrome metabólico, tales como la obesidad y DM2. Es importante resaltar que a la fecha, no existen reportes que indiquen si las propiedades que se le atribuyen a los gorgojos chinos pudieran ser debidas a la presencia de BAL como el *Lactococcus subsp. cremoris* que produce ácido linoleico conjugado (ALC) y al sinergismo que este pudieran darse con las benzoquinonas, crotoxinas, pentadecenos, hidroquinonas, terpenos, ácidos grasos, colesterol y ésteres que los gorgojos chinos segregan como mecanismo de defensa, siendo éstos, que de acuerdo a lo reportado en la literatura son los que les confieren propiedades antiinflamatorias, antioxidantes y anticáncerígenas para el tratamiento de este tipo de enfermedades.



5. Hipótesis

- 5.1 Si los gorgojos chinos son portadores de bacterias ácido lácticas con actividad probiótica, entonces los efectos benéficos en la salud de los consumidores podría estar relacionada con la presencia de éstas.
- 5.2 Sabiendose que las BAL poseen propiedades benéficas en la salud de los consumidores, sí se aíslan y purifican BAL a partir de los gorgojos chinos y con éstas se elaboran alimentos y bebidas fermentadas, se esperaría un efecto benéfico en la salud de personas con enfermedades derivadas del síndrome metabólico tales como DM2.

6. Metodología.

Los reactivos usados para desarrollar este proyecto de investigación fueron marca Sigma Aldrich, los medios de cultivo fueron marca Becton Dickinson.

Para cumplir con los objetivos planteados, se llevarón a cabo las siguientes metodologías; Tinción Gram, catalasa, oxidasa, producción de CO₂ en caldo MRS con glucosa al 5%, crecimiento a diferentes pHs (4.4 y 9.6), temperaturas (10 y 45 °C) y concentraciones de NaCl (6.6 y 18 %), identificación bioquímica de las cepas mediante los sistemas API 50 CH, API 50 CHL y API 20 Strep y la elaboración de bebidas lácticas fermentadas. (**Figura 8-Figura 19**).

En la **Figura 8**, se presenta un Diagrama de Flujo General en el que se ejemplifica la metodología realizada durante el aislamiento y la identificación mediante pruebas bioquímicas primarias y secundarias de las cepas aisladas.

En la **Figura 9**, se muestran las pruebas bioquímicas complementarias que permite visualizar la capacidad de las cepas aisladas para fermentar diferentes carbohidratos (sistema API 50 CH).

En la **Figura 10- Figura 13**, se muestra el fundamento de cada una de las pruebas realizadas.

En la **Tabla 11** se indica como se preparó el nefelómetro MacFarland.

Aislamiento e identificación de bacterias probióticas a partir del gorgojo chino y sus usos potenciales en la elaboración de alimentos nutracéuticos.

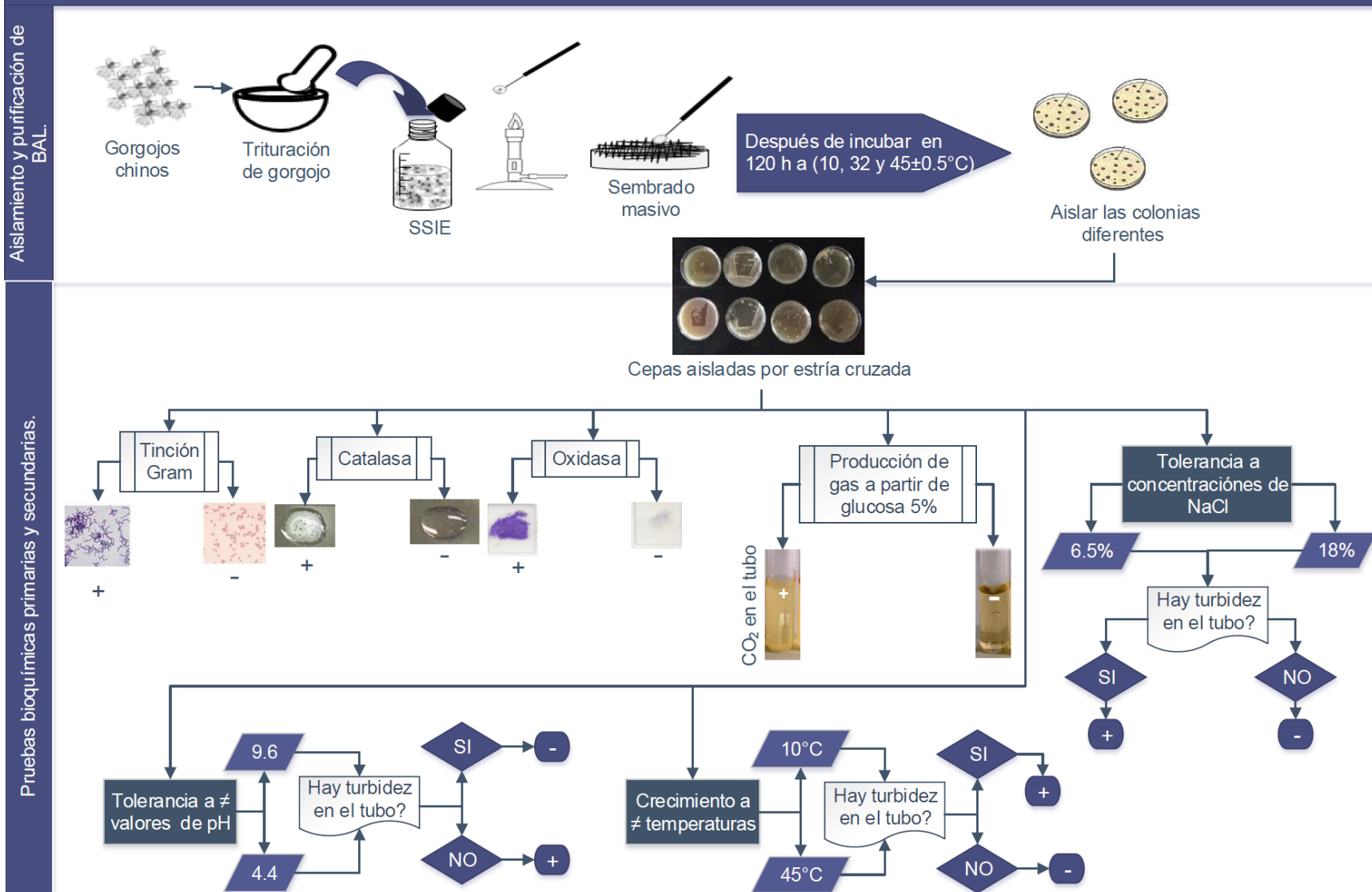


Figura 8. Diagrama de flujo del procedimiento de asilamiento de BAL a partir del gorgojo chino pruebas bioquímicas primarias y secundarias.

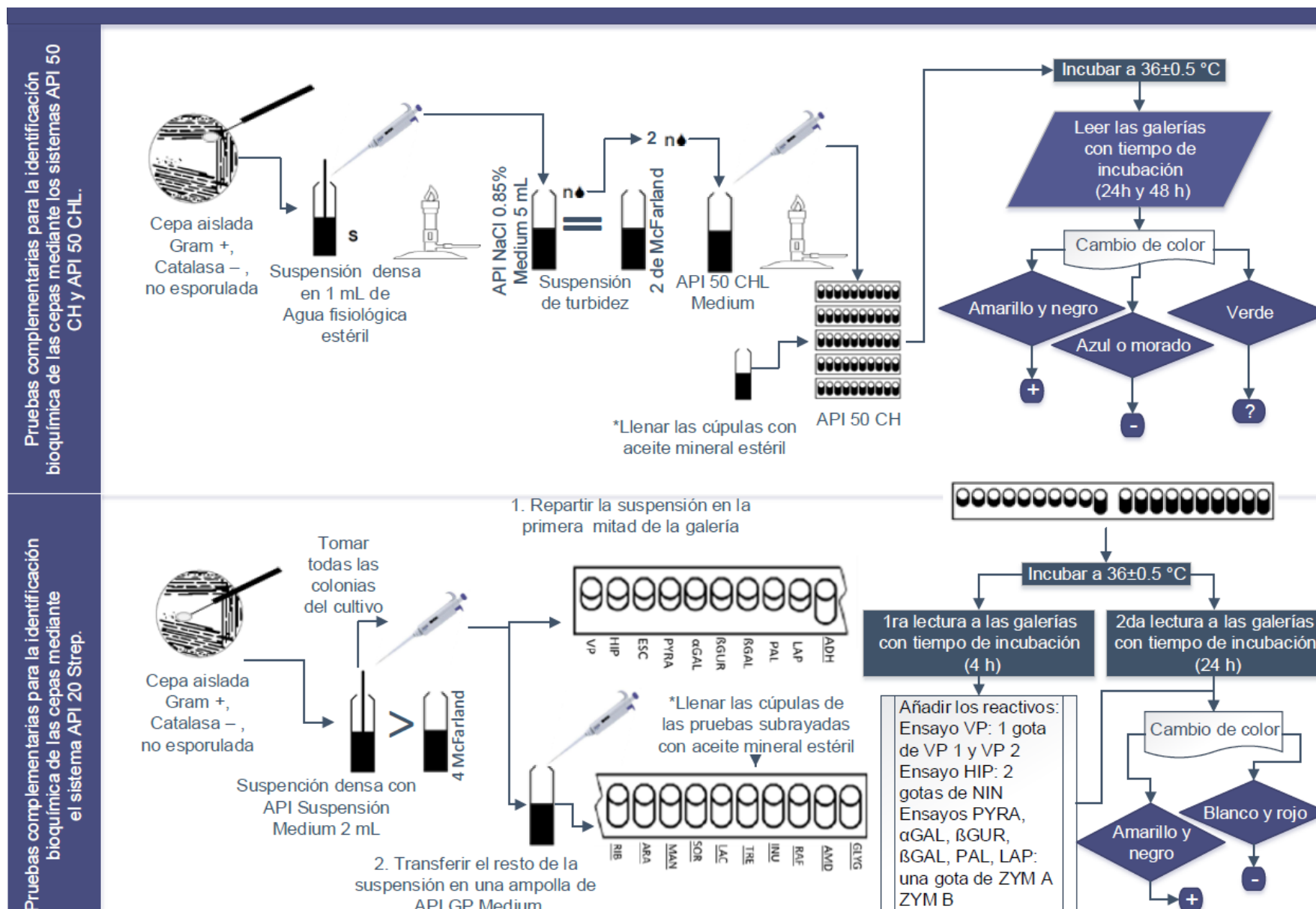


Figura 9. Diagrama de flujo del procedimiento de la identificación bioquímica de las cepas aisladas mediante los sistemas API 50 CH, API 50 CHL y API 20 Strep.

6.1 Aislamiento y purificación de BAL a partir de *Ulomoides dermestoides*.

Esterilizar los materiales a usar (mortero con pistilo, espátula y pinzas), triturar 10 g de gorgojos en condiciones de esterilidad en un mortero y colocar en una botella de dilución con 90 mL de solución salina isotónica estéril y agitar vigorosamente, sembrar en cajas con medio de cultivo MRS, agar (MSE, M17 y APT), e incubar a temperaturas de 10, 32 y 45 ± 0.5 °C en condiciones anaerobias, después de 5 días observar crecimiento bacteriano con morfologías (macroscópicas y microscópicas). Una vez aisladas se numeran las diferentes colonias puras (**Figura 10**).

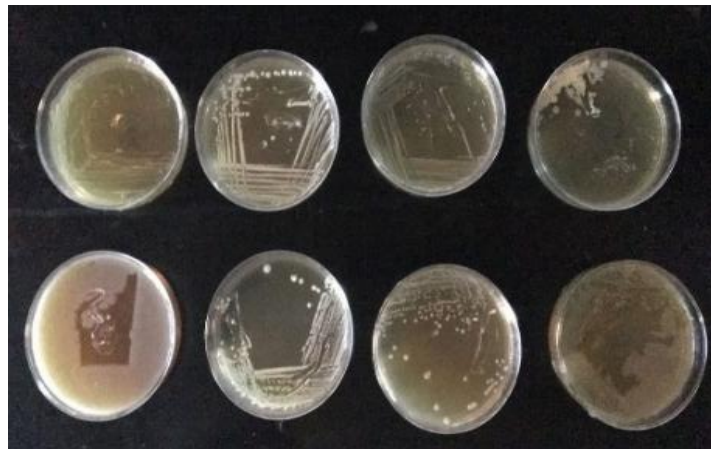


Figura 10. Cepas BAL aisladas.

6.2 Pruebas bioquímicas primarias.

Tinción Gram. Esta prueba se usó para clasificar a las bacterias por su composición de la pared celular en Gram positivas o Gram negativas y para conocer la morfología celular. La tinción se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Pérez *et al.*, 1987.

Colocar en un portaobjetos una gota de agua estéril y con el asa bacteriológica se toma un pequeño inóculo de una colonia aislada y pura a identificar, mezclar y dejar evaporar el agua, fijar al calor, teñir con una solución de cristal violeta (1 min), cubrir toda la muestra con lugol (1 min), enjuagar y decolorar con una solución alcohol-acetona (15-30 seg), lavar con agua, finalmente, teñir con safranina (1 min), enjuagar y secar las muestras al aire durante unos minutos, observar al microscopio a 10X, 40X y 100X. Seleccionar las bacterias Gram positivas (**Figura 11**).

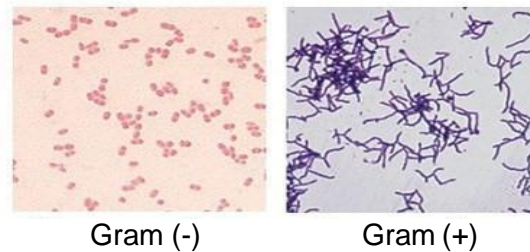


Figura 11. Resultados de Tinción Gram.

Catalasa. Esta prueba identifica las bacterias que sintetizan la enzima catalasa, es una enzima que posee la mayoría de las bacterias aerobias, se caracteriza por descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno, (Naudi *et al.*, 1999).

Con un palillo grueso de madera estéril tomar una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo fresco (no más de 24 h), colocar en un portaobjetos y añadir una 1 gota de peróxido de hidrógeno (30%). Un resultado positivo se manifiesta por la aparición instantánea de burbujas (**Figura 12**).

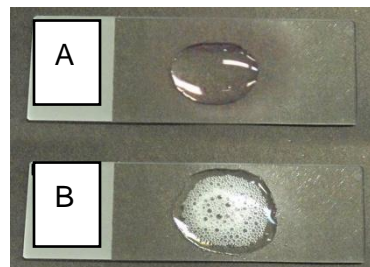


Figura 12. Resultado de Catalasa
(A): negativo, (B): positivo.

Oxidasa. Esta prueba está basada en la identificación de una enzima bacteriana llamada citocromo C oxidasa y se le conoce como prueba de oxidasa.

Con un palillo grueso de madera estéril tomar una muestra bacteriana a partir de una colonia aislada proveniente de un cultivo fresco (no más de 24 h), dispersar la muestra en contacto con un disco reactivo de oxidasa, la reacción positiva se observa cuando hay una coloración morada en un lapso no mayor de 30 segundos, de lo contrario el resultado se reporta como negativo (**Figura 13**).

Prueba positiva indica que la bacteria posee citocromo C oxidasa, esto significa que la bacteria puede usar oxígeno para producir energía, mediante una cadena de transporte de electrones.

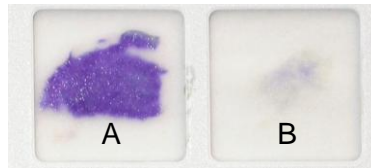


Figura 13. Resultado de oxidasa
(A): positivo, (B): negativo.

6.3 Pruebas bioquímicas secundarias.

Producción de gas a partir de glucosa al 5%. Para determinar la producción de CO₂ se utilizó caldo MRS con glucosa al 5% en tubos con campana de Durham. Las cepas puras se inoculan y se incuban a 32°C durante 72 horas. La prueba será considerada positiva si existe presencia de gas en el tubo (**Figura 14**).

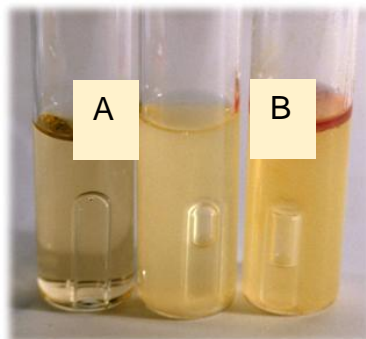


Figura 14. Resultado de CO₂
(A): negativo, (B): positivo.

Tolerancia a distintas concentraciones de cloruro de sodio. La tolerancia de las cepas puras al cloruro de sodio se determina inoculándolas en caldo MRS suplementado con un 6.5% y un 18% de cloruro de sodio incubándolas a 32°C durante 72 horas. La prueba será considerada positiva si existe turbidez en el tubo, lo que indica crecimiento.

Tolerancia a distintos valores de pH. La tolerancia al pH de las cepas puras se determina inoculándolas en caldo MRS con el pH ajustado a 4.4 y 9.6 con HCl 1M

y NaOH 10M. Los cultivos se incuban a 32°C durante 72 horas. La prueba será considerada positiva si existe turbidez en el tubo, lo que indica crecimiento.

Crecimiento a diversas temperaturas. Las cepas puras se inoculan en caldo MRS y se incuban a temperaturas de 10°C y 45°C durante 72 horas. La prueba será considerada positiva si existe turbidez en el tubo, lo que indica crecimiento.

6.4 Identificación bioquímica de las cepas mediante los sistemas API 50 CH y API 50 CHL.

Fundamento del método. La identificación se basa en determinar la capacidad de los microorganismos de fermentar los diferentes carbohidratos contenidos en el sistema y sus derivados: heterósidos, polialcoholes y ácidos urónicos (Kandler y Weiss, 1992) por el sistema API 50 CH, el cual consiste en un dispositivo de plástico con 50 microtubos que contienen diferentes azúcares y sus derivados (**Tabla B**).

Preparación de cultivos. La cepa a identificar se activa inoculándola en tubos con 5 mL de caldo MRS, los tubos se incuban por 96 horas en condiciones anaerobias a 45°C. Posteriormente se siembran cada una de las cepas en agar MRS y se incuban por 48 horas.

Preparación del inóculo. Tomar una gran asada de la bacteria a identificar y realizar una suspensión densa en una ampolla con 2 mL de agua destilada estéril (etiquetar como solución "S"). Posteriormente en un tubo con 5 mL de agua destilada estéril, agregar gotas de la suspensión S, hasta igualar la turbidez al patrón 2 de MacFarland contar y anotar el número de gotas (n).

En una ampolleta de API 50 CHL Medium, inocular 2 veces el número de gotas (n) contadas y homogeneizar. Con la ayuda de una pipeta estéril llenar los 50 tubos de la galería API 50 CH (**Figura 15**), con aproximadamente 130 µL del medio API 50 CHL Medium, y cubrir con aceite mineral estéril. Incubar a 29°C ± 2°C ó 36°C ± 2°C, durante 48 horas (**Figura 16**).

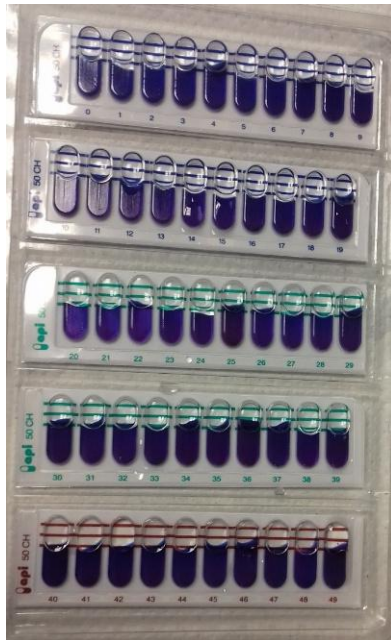


Figura 15. Galería API CH con medio de cultivo API 50 CHL inoculado con una cepa ácido láctica.



Figura 16. Expresión de resultado por cambio de color del medio API 50 CHL. Dónde: azul: negativo, amarillo y negro: positivo, verde: dudoso.

Tubos de turbidez de McFarland. Los patrones de McFarland se usan como referencia en suspensiones bacteriológicas para saber la Unidad Formadora de Colonias (UFC) por mililitro.

Tabla 11. Preparación de nefelómetro de Macfarland.

mL BaCl ₂ 1%	mL H ₂ SO ₄ 1%	UFC/mL
0.1	9.9	3x10 ⁸
0.2	9.8	6 x10 ⁸
0.3	9.7	9 x10 ⁸
0.4	9.6	1.2 x10 ⁹
0.5	9.5	1.5 x10 ⁹
0.6	9.4	1.8 x10 ⁹
0.7	9.3	2.1 x10 ⁹
0.8	9.2	2.4 x10 ⁹
0.9	9.1	2.7 x10 ⁹
1	9	3 x10 ⁹



6.5 Identificación bioquímica de las cepas mediante el sistema API 20 Strep

Fundamento del método. La galería API 20 Strep se compone de 20 microtubos que contienen los substratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares (**Tabla C**).

Las reacciones que se producen durante el período de incubación se traducen en variaciones de color, espontánea o reveladora mediante la adición de reactivos.

Preparación de cultivos. En una ampolla de API Suspensión Medium (2mL), tomar todas la colonias del cultivo con una asa bacteriológica y realizar una suspensión muy densa (turbidez superior a 4 de McFarland). En la primera mitad de la galería (desde el ensayo VP al ADH), repartir la suspensión anterior, para los ensayos desde VP a LAP agregar aprox. 100 μ l en cada cúpula, para el ensayo ADH: llenar únicamente el tubo.

En la segunda mitad de la galería (desde el ensayo RIB al GLYG): Abrir una ampolla de API GP Medium y transfir allí el resto de la suspensión y homogenizar. Repartir esta nueva suspensión sólo en los tubos, llenar las cúpulas de las pruebas subrayadas desde ADH a la GLYG con aceite mineral estéril incubar a $36^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ en anaerobiosis durante 4 horas (primera lectura) y 24 horas (segunda lectura).

Lectura e interpretación.

Después de 4 horas de incubación añadir los reactivos:

- Ensayo VP (Piruvato sódico): 1 gota de VP 1 y VP 2.
- Ensayo HIP (Ácido hipúrico): 2 gotas de NIN.
- Ensayos PYRA (Ácido piroglutámico β -naftilamida), α GAL (6-bromo-2-naftil- α D-galactopiranosida), β GUR (Ácido naftol-ASBI-glucorónico), β GAL (2-naftil- β D-galactopiranosida), PAL (2-naftil fosfato), LAP (L-leucina- β -naftilamida): una gota de ZYM A ZYM B.



Figura 17. Expresión de resultados al añadir los reactivos al medio API 20 Strep. Dónde: rosa, azul, negro, naranja y amarillo: positivo; blanco, café y rojo: negativo.

6.6 Conservación de las cepas.

Una vez que las cepas son puras e identificadas, sembrar por duplicado en tubos en pico de flauta con agar MRS, incubar a 45°C durante 72 horas. Una vez crecidas, agregar glicerol al 20% estéril para conservarlas a una temperatura de $-20 \pm 1^\circ\text{C}$.



Figura 18. Cepas conservadas en pico de flauta con agar MRS.

6.7 Elaboración de bebidas lácticas fermentadas

Preparación del preinóculo. Preparar un preinóculo para cada bacteria a probar, en leche pasteurizada inocular 0.1 mL de cada cepa ajustada al tubo 5 de MacFarland e incubar durante 24 horas a $45 \pm 0.5^\circ\text{C}$, una vez transcurrido ese tiempo volver a inocular en frascos con 500 mL de leche pasteurizada, y dejar fermentar durante 6 horas, medir el pH y la acidez a las 3 y 6 horas.

Determinación de acidez titulable expresada como ácido láctico, método 942.15 (AOAC, 2000).

Pesar 9 gramos de muestra de yogurt en un matraz erlenmeyer, adicionar 20 mL de agua destilada y agregar 3 a 5 gotas de fenolftaleína 1%, titular con la solución de NaOH 0.1N (el final de la valoración es cuando se obtiene un color ligeramente rosado y persiste con la agitación) (**Figura 19**).

Calcular el porcentaje de acidez usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ácido láctico} = \left(\frac{(\text{mL de NaOH gastados})(0.1\text{N})(90 \text{ g/mol Ác. láctico})}{(\text{g pesados de muestra})} \right) (100)$$



Figura 19. Determinación de acidez titulable.

7. Resultados.

Los resultados fueron interpretados utilizando el siguiente esquema

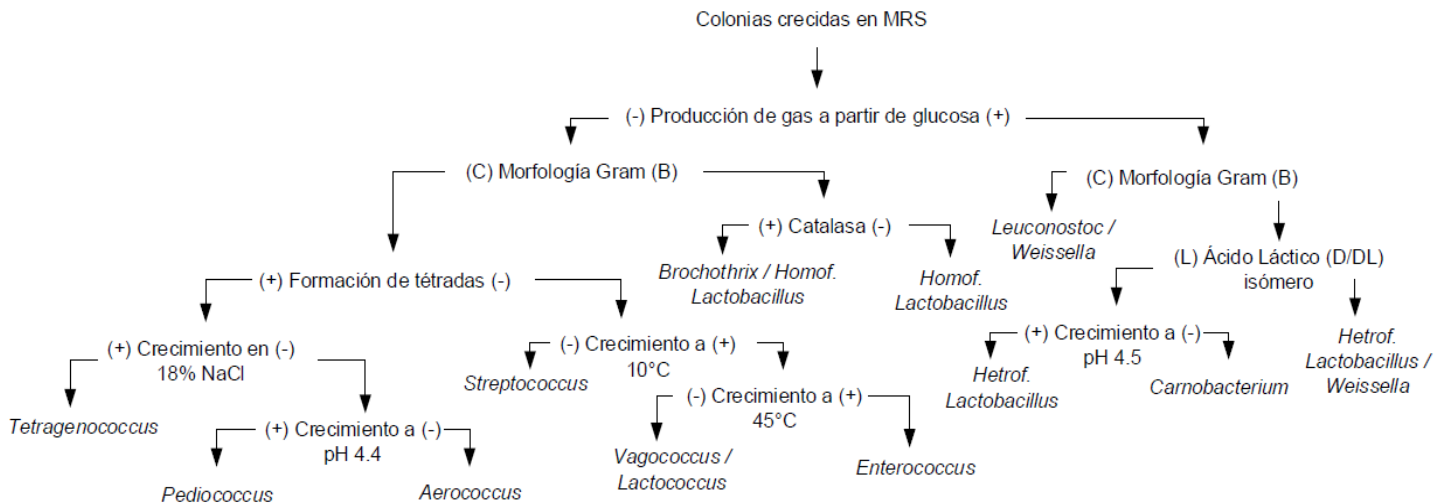



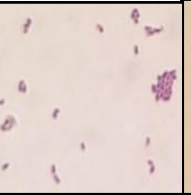



Figura 20. Diagrama de flujo para la identificación de géneros BAL por características fenotípicas. C: cocos; R: bacilos; (-): negativo; (+): positivo; L, D y DL. El diagrama de flujo fue adaptado de Schillinger y Lücke (1989).





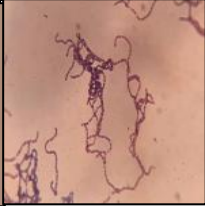
Se aislaron y se purificaron 10 cepas de BAL a partir del gorgojo chino, los criterios de clasificación para la identificación de género de las cepas aisladas y seleccionadas se basó en la comparación de tablas y esquemas reportadas por Daneysa *et al.*, 2015 (Tabla A y Figura 20). En la Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y Tabla 15 se muestran los resultados obtenidos de las pruebas de identificación bioquímica de las 10 cepas.

Tabla 12. Caracterización microbiológica y bioquímica de las cepas aisladas.

Medio		MRS	MRS	MRS	APT	MSE
Número cepa		7	11	10	25	21
T. Crecimiento (°C)		45	45	45	32	37
Morfología colonial	Forma	Irregular	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme	Circular
	Elevación	Plana	Convexo	Plana	Elevada	Elevada
	Borde	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
Foto						
Morfología microscópica		Bacilos empalizados letras chinas	Cocos, diplococos tétradas	Cocos. Tétradas, diplococos	cocos racimos, cadenas cortas	Cocos, cadenas cortos
Catalasa		-	-	-	-	-
Medición promedio % acidez titulable (2 días)		0.87	0.55	0.48	0.45	0.33
Medición promedio % acidez titulable (6 días)		1.37	0.30	0.49	0.57	0.46
pH (2 días)		5	5	5	6	5
PH (40 días)		4.62	4.59	4.82	5.36	5.7
CO ₂ a partir de 5% glucosa		-	-	-	-	+
Crecimiento a 10°C		±	-	-	-	-
Crecimiento a 45°C		+	+	±	+	+
Crecimiento en 6.5% NaCl		±	+	-	+	++
Crecimiento en 18% NaCl		+	±	±	-	++
Crecimiento a pH 4.4		+	+	-	-	++
Crecimiento a pH 9.6		+	-	+	++	++
Olor de la leche		Frutado	queso, acido, avinagrado, dulce	ligeramente yogurt natural	yogurt acido, suero de queso	No probado
Consistencia en leche		grumosa	grumoso	grumoso	cuajado	No probado

+: Positivo; -: negativo; ±: dudoso

**Tabla 12.** Caracterización microbiológica y bioquímica de las cepas aisladas (Continuación).

Medio		M17	MRS	MRS	MRS	MRS
Número cepa		13	24	22	6	27
T. Crecimiento (°C)		10	45	TA	45	32
Morfología colonial	Forma	Puntiforme	Puntiforme	Puntiforme	Irregular	Puntiforme
	Elevación	Plana	Convexa	Convexo	Elevada	Convexo
	Borde	Entero	Entero	Entero	Entero	Entero
Foto						
Morfología microscópica		Cocobacilos, racimos, diplococos, estreptococos	Cocos, cadenas cortas, diplococos, sarcinas	Bacilos cortos, tétradas, pares	Bacilos empalizados	Cocos cadenas largas
Catalasa		-	-	-	-	-
Medición promedio % acidez titulable(2 días)		0.25	0.39	0.28	0.6	No probado
Medición promedio % acidez titulable(6 días)		0.17	0.39	0.2	0.15	No probado
pH en leche (2 días)		7	6	6	6	No probado
PH en leche (40 días)		4.96	7	6	4.78	No probado
CO ₂ a partir de 5% glucosa		-	-	-	-	-
Crecimiento a 10°C		+	-	+	+	-
Crecimiento a 45°C		+	+	+	+	+
Crecimiento en 6.5% NaCl		+	+	+	-	±
Crecimiento en 18% NaCl		++	+	+	+	±
Crecimiento a pH 4.4		-	+	+++	-	-
Crecimiento a pH 9.6		+	+	++	-	+
Olor de la leche		Búlgaros intenso, queso parmesano	Yogurt afrutado	No probado	Olor agradable yogurt, búlgaro	No probado
Consistencia en leche		Líquida	Grumosa	No probado	grumoso espeso	No probado

TA: temperatura ambiente

8. Análisis de resultados y discusión.

Tabla 13. Géneros identificados de las cepas aisladas de acuerdo Schillinger y Lücke (1989).

Número de cepa aislada	Morfología microscopia	Géneros identificados
13	Cocobacilos	<i>Lactococcus</i>
7	Bacilos	<i>Lactobacillus</i>
11	Cocos	<i>Pediococcus, Tetragenococcus</i>
10	Cocos	<i>Streptococcus, Lactococcus</i>
25	Cocos	<i>Pediococcus, Lactococcus</i>
6	Bacilos	<i>Lactobacillus</i>
24	Cocos	<i>Pediococcus</i>
22	Bacilos	<i>Lactobacillus</i>
21	Cocos	<i>Lactococcus, Pediococcus</i>
27	Cocos	<i>Streptococcus</i>

Con los datos presentados en la **Tabla 12** y **Tabla 13**, se identificaron los géneros de las cepas aisladas y en los sistemas API 50 CH y API 20 Strep se identificarón los géneros y especies de las cepas aisladas (**Tabla 14** y **Tabla 15**).

Tabla 14. Identificación bioquímica de las cepas BAL con el Sistema API 50 CHL.

Número de cepa	Identificación
7	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
11	<i>Pediococcus pentosaceus 1</i>
10	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis 1</i>
25	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
6	<i>Lactobacillus plantarum 1</i>
24	<i>Pediococcus pentosaceus 2</i>
22	<i>Lactobacillus acidophilus 3</i>
27	<i>Streptococcus thermophilus</i>



Tabla 15. Identificación bioquímica de las cepas BAL con el Sistema API 20 Strep.

Número de cepa	Identificación
13	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
21	<i>Lactococcus raffinolactis</i>

Se lograron aislar e identificar las siguientes BAL: 2 de *Lactobacillus plantarum*, 2 de *Pediococcus pentosaceus*, 2 de *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus raffinolactis* y *Streptococcus thermophilus* las cuales pertenecen al grupo de las BAL. De acuerdo a datos reportados en la literatura las bacterias aisladas se encuentran dentro de la clasificación de bacterias probióticas y categoría GRAS.

Los ***Lactobacillus*** se asocian frecuentemente con efectos promotores de la salud en humanos y animales, debido a su capacidad de digerir a la lactosa y disminuir la intolerancia a éste azúcar, la cual ha sido reconocida como un problema en muchos niños y en la mayoría de los adultos de todo el mundo (Heyman, 2006).

Lactobacillus acidophilus, produce una variedad de compuestos antimicrobianos que incluyen ácido láctico (>85%), peróxido de hidrógeno y numerosas bacteriocinas de péptidos que inhiben el crecimiento de patógenos tales como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* y *Candida albicans* (Servin, 2004; Wagner *et al.*, 1997), dichas actividades antimicrobianas permitirán a *L. acidophilus* modular la composición de la Microbiota y disminuir el riesgo de infección gastrointestinal y de la diarrea. El consumo de *L. acidophilus* disminuye aquellas poblaciones bacterianas del colón involucradas en la expresión de actividades enzimáticas procarcinogénicas azoreductasa, nitroreductasa y β -glucuronidasa, además ejerce un efecto protector en modelos animales de cáncer colónico, el *L. acidophilus* posee una actividad β -galactosidasa que permanece activa en el intestino, esta actividad facilita la digestión de la lactosa y disminuye la sintomatología digestiva en los sujetos hipolactásicos que consumen productos lácteos con este probiótico (Varcoe *et al.*, 2003; Goldin *et al.*, 1980).



Lactobacillus plantarum, se encuentra en los alimentos y en el tracto gastrointestinal humano, produce sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, ácido acético y láctico. Un estudio realizado por Boch *et al.*, en el 2011, diseñó un estudio clínico que demostró que el consumo del probiótico *L. plantarum* mejora el tránsito intestinal en ancianos, el número de individuos con estreñimiento y con frecuencia de defecación inferior a 3 veces por semana, disminuyó significativamente, el efecto empezó a manifestarse a partir del segundo mes de consumo del probiótico, se presentaron beneficios para el estado de salud como la regulación del tránsito intestinal, la mejora del estado nutricional y la estimulación del sistema inmune.

Lactococcus raffinolactis, fermenta α -galactosidasa como melobiosa y rafinosa. No es una especie empleada en la industria láctea porque carece de actividad caseinolítica (Boucher *et al.*, 2003). Algunas cepas han producido niveles aceptables de acetaldehído y diacetilo, no crece a 40°C, se presenta actividad antibacteriana frente a patógenos de pescado como *Aeromonas* de las especies *A. Salmonicida* JCM 7874, *A. hydrophila* JCM 1027 y *A. caviae* JCM 1060 (Hagi y Hoshino, 2009).

Las cepas pertenecientes al género ***Pediococcus*** se han probado y usado como bacterias probióticas (Vidhyasagar y Jeevaratnam, 2013), se llegó a la conclusión de que las cepas exhibían inhibición del crecimiento de patógenos Gram positivos y Gram negativos intestinales y que podían usarse en alimentos funcionales como cepas probióticas. Dubey *et al.*, en el 2015, informaron sobre las cepas ***Pediococcus pentosaceus*** que tienen alta supervivencia en el fluido gastrointestinal simulado, y propiedades antioxidantes y de biohidrogenación, además, que *Pediococcus pentosaceus* es una bacteria probiótica prometedora con propiedades biológicas potencialmente superiores, especialmente al mejorar el rendimiento del crecimiento, el equilibrio de la microbiota intestinal (Hernández *et al.*, 2018).



La cepa ***Lactococcus lactis*** se usa ampliamente en la industria láctea como cultivo inicial para una variedad de productos. Las principales funciones de esta especie en la fermentación láctea son la producción de ácido láctico a partir de lactosa, la hidrólisis de la caseína y la fermentación del ácido cítrico (Samaržija *et al.*, 2001).

Lactococcus lactis subsp. lactis se caracteriza por producir nisina el cual tiene un efecto antimicrobiano y es utilizada como conservador de alimentos inhibiendo el desarrollo de bacterias Gram positivas especialmente géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria*, siendo la nisina la única bacteriocina reconocida por la FDA con la categoría GRAS.

Un estudio dirigido por la Universidad de Michigan, publicado en el *Journal of Applied Microbiology* en el año 2016, demostró que la nisina que produce este tipo de BAL, puede retrasar o detener los cánceres de cabeza, oral y tumores, dicho estudio fue realizado solo en ratones y se encontró que la nisina mató entre el 70% y 80% de las células cancerígenas de los roedores, sin embargo, no se ha demostrado la función en humanos, lo cual se pretende realizar un estudio clínico con el fin de encontrar un posible cura natural contra el cáncer (Shin *et al.*, 2016).

El ***Lactococcus lactis subsp. cremoris*** se ha demostrado que aumenta el contenido de ácidos grasos poliinsaturados y el ácido linoleico conjugado (ALC) mientras que al mismo tiempo reduce significativamente los ácidos grasos saturados y el índice trombogénico en la leche fermentada (Vieira *et al.*, 2017).

El ácido linoleico conjugado (ALC) describe los isómeros geométricos y posicionales del ácido linoleico (C18:2, *cis*-9, *cis*-12), que contienen un sistema de doble enlace donde cada uno de los dos enlaces dobles puede estar en configuración *cis* o *trans*, y en diferentes posiciones a lo largo de la cadena de 18 carbonos, resultando en 28 posibles isómeros, en los cuales los isómeros activos más comunes y asociados a la salud son *cis*-9, *trans*-11-ALC y *trans*-10, *cis*-12-ALC (**Figura 21**). Diferentes estudios, tanto *in vitro*, han demostrado una variedad de efectos benéficos para la salud, tales como actividades anti-cancerígenas, anti-ateroscleróticas, anti-oxidantes, anti-inflamatorias y la estimulación de deposición

de masa muscular magra, anti-obesidad y por ende enfermedades asociadas a síndrome metabólico tales como (Diabetes *Mellitus* tipo 2) (Yang *et al.*, 2015).

La ingesta de dietas ricas en ALC en humanos ha demostrado un potencial antiinflamatorio (Penedo *et al.*, 2013) y anticancerígeno sobre varios casos de cáncer humano (De la Torre *et al.* 2006).

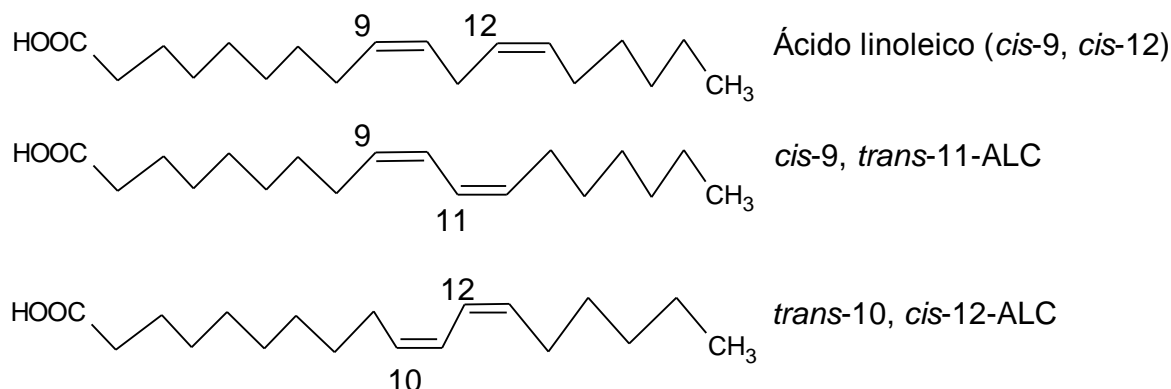


Figura 21. Estructuras del ácido linoleico y los isómeros biológicamente activos más comunes del ácido linoleico conjugado (ALC) (Yang *et al.*, 2015).

Efectos beneficiosos del ALC sobre las enfermedades.

Efectos del ALC en el cáncer.

El ALC es un inhibidor eficiente de todas las etapas de la carcinogénesis (iniciación, promoción y metástasis) (Belury, 2002), así como neovascularización o angiogénesis (Masso *et al.*, 2004). Se informa que los isómeros *cis*-9, *trans*-11, *cis*-12-ALC inhiben el cáncer a través de diferentes mecanismos de acción (**Figura 22**), ya que *cis*-9, *trans*-11-ALC parece afectar preferentemente el metabolismo del ácido araquidónico y disminuye la 5-lipoxigenasa (LOX), la ciclooxigenasa (COX), la expresión que conduce a niveles reducidos de prostaglandina E2 (PGE2) y tromboxano B2 (TB2) (Ochoa *et al.*, 2004) e inhibe la activación de NF-κB (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, complejo proteico contra la transcripción del ADN) que está relacionada con el cáncer (Yang *et al.*, 2015; Rakib *et al.*, 2013). Se demostró que la regulación descendente de la señalización de NF-κB mediante *cis*-9, *trans*-11-ALC retrasa el desarrollo de cáncer de piel en ratones (Hwang *et al.*, 2007). También se demostró

la influencia del ALC en el cáncer de mama y próstata en humanos y un claro efecto proapoptótico, además, se ha comprobado que *trans*-9, *trans*-11-ALC, *trans*-10, *trans*-12-ALC y otros isómeros menores tienen actividad antiproliferativa contra diferentes células tumorales, incluido el cáncer de colon humano y el cáncer de mama (El Roz *et al.*, 2013; Degen *et al.*, 2011; Rabik *et al.*, 2011; Coakley *et al.*, 2006).

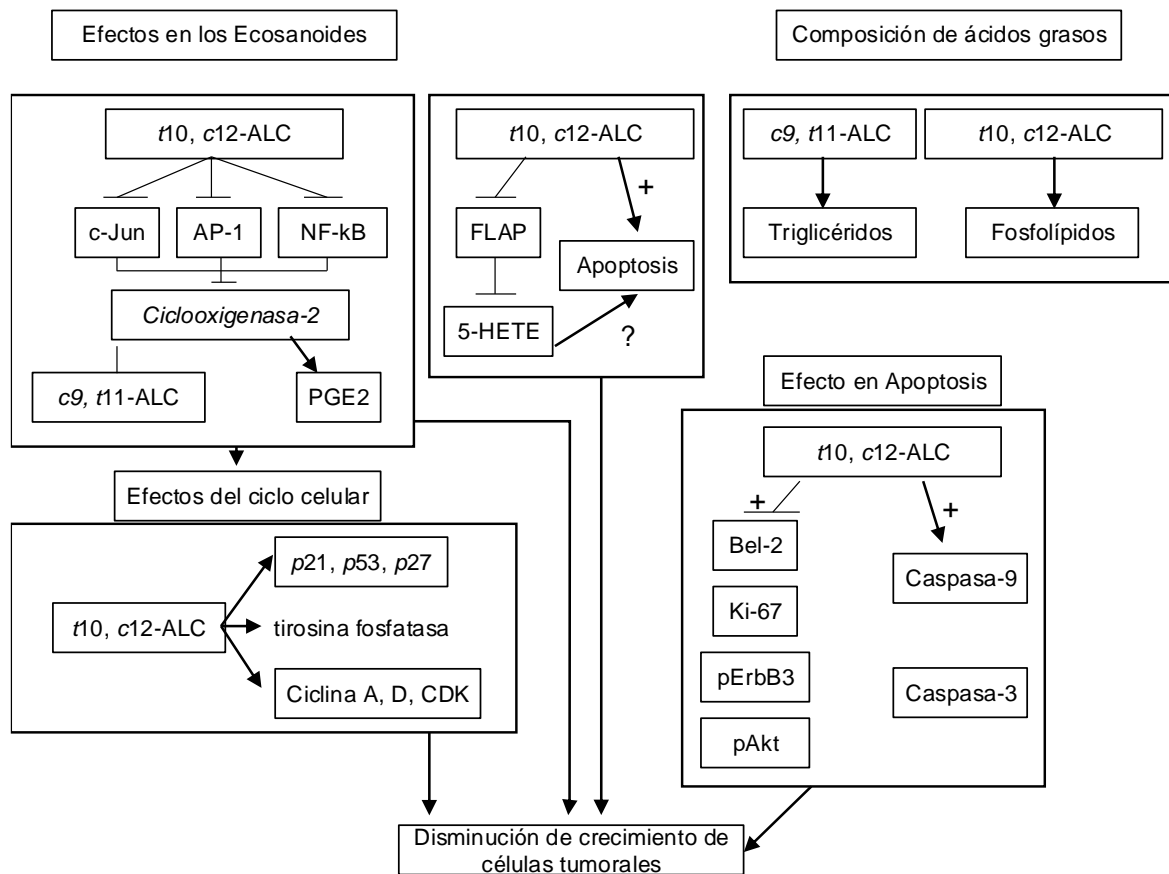


Figura 22. Posibles mecanismos de tumorigénesis alterada por ALC (Kelley *et al.*, 2007).

El ALC afecta el metabolismo del ácido araquidónico y disminuye la LOX y la COX, lo que lleva a una disminución de la PGE2 y TB2 y a la inhibición de la activación de NF-kB. El ALC influye en la apoptosis por la modulación de las proteínas Bcl-2 y ki-67, así como en la fosforilación de ErbB3 y Akt y el aumento de las caspasas Kappa-cadena ligera potenciador de las células B activadas; PGE2: prostaglandina E2; CDK: quinasa dependiente de ciclina; FLAP: proteína activadora de 5-lipoxigenasa; 5-HETE: ácido hidroxiicosatetraenoico; Bcl-2: linfoma de células B2; pErbB3: tirosina-proteína quinasa del receptor fosforilado; pAkt: proteína cinasa B fosforilada (Yang *et al.*, 2015).

Efectos del ALC sobre la obesidad.

Se ha demostrado que la suplementación con *trans*-10, *cis*-12-ALC produce una reducción de la grasa corporal en varios modelos animales, incluidos ratas, hámsters, cerdos y también en humanos (Rosberg *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2010; Moon *et al.*, 2009; Atkinson, 1999). Los ratones parecen ser los que mejor responden a la suplementación con ALC, con una reducción de la grasa corporal entre 40 y 80% obtenida luego de alimentación con ALC al 0.5%, con dietas altas o bajas en grasa (West *et al.*, 2000). Se ha demostrado que la alimentación con *trans*-10, *cis*-12-ALC inhibe la transcripción de enzimas involucradas en la síntesis de ácidos grasos *de novo*, la desaturación de ácidos grasos y la síntesis de triacilglicerol (Ma *et al.*, 2014) (**Figura 23**).

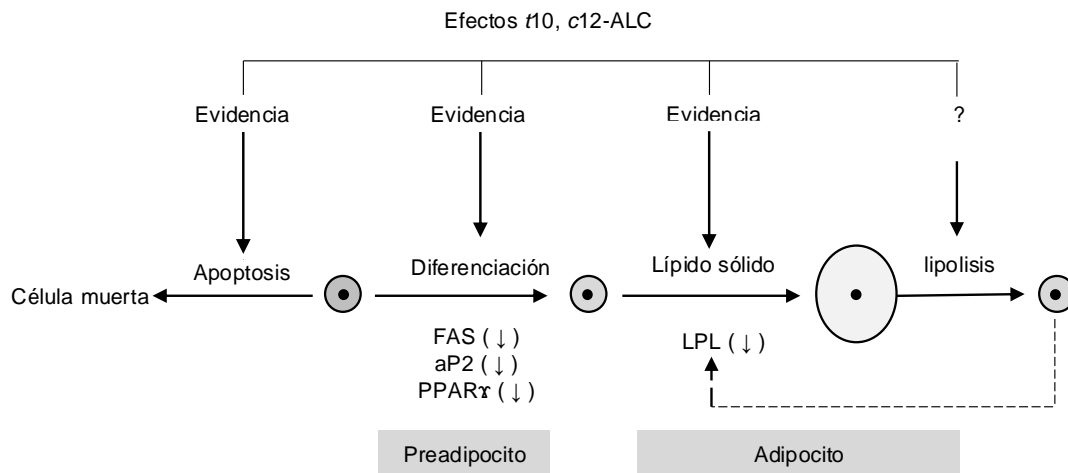


Figura 23. Modelo de los efectos de *trans*-10, ácido linoleico conjugado con *cis*-12 (ALC) en adipocitos y preadipocitos, *trans*-10, *cis*-12-ALC inhibe las enzimas en la síntesis y el metabolismo de los ácidos grasos, como el FAS y la esteroil. CoA desaturasa, mejora la oxidación de los ácidos grasos, la lipólisis para alterar el almacenamiento de triglicéridos de los adipocitos y el PPAR- α , y algunos genes como ACBP, aP2 y LPL (FAS: ácido graso sintetasa; aP2, proteína de unión a lípidos de adipocitos; PPAR α : receptor activado por proliferador de peroxisoma α ; LPL: heparina liberada).

Efectos del ALC en la inflamación.

Se ha informado que el ALC exhibe propiedades antiinflamatorias tanto *in vitro* como en cultivos celulares mediante la inhibición de la COX-2, lo que lleva a una disminución en la liberación de PGE2 y la producción de citoquinas proinflamatorias en sentido descendente (Flowers y Thompson, 2009).

Tricon *et al.*, en el 2004, mostraron que los seres humanos sanos que recibieron la mezcla de 80:20 de *cis*-9, *trans*-11-ALC, *trans*-10, *cis*-23-ALC durante 8 semanas disminuyeron la activación de los linfocitos T y, por tanto, influyeron positivamente en la función inmune.

Efecto del ALC en la diabetes.

Se ha demostrado que el ALC en la dieta resulta la sensibilidad a la insulina, disminuye la glucosa sérica y los niveles de insulina en ratas diabéticas *fa/fa*, normaliza la tolerancia a la glucosa, aumenta los niveles plasmáticos de adiponectina en ratas diabéticas Zucker (ZDF) (Castro *et al.*, 2012; McFarlin *et al.*, 2009) y mejora la sensibilidad a la insulina en humanos sedentarios jóvenes (Castro *et al.*, 2012, Rubin *et al.*, 2012), pero estos efectos podrían ser específicos de los isómeros *trans*-10 y *cis*-12-ALC (Yang *et al.*, 2015).

Efectos del ALC en la aterosclerosis.

La aterosclerosis es otra condición de inflamación crónica. Se ha encontrado que la suplementación dietética con ALC induce la reducción de la aterosclerosis a niveles tan bajos como el 0.1% de la dieta, y el 1% de ALC, se eliminó totalmente la esteroclerosis en el modelo de ratón knockout para Apolipoproteína E (ApoE) (proteína con 299 aminoácidos de largo que transporta lipoproteínas, vitaminas liposolubles y colesterol hacia el sistema linfático y luego a la sangre) propenso a la aterosclerosis suplementado con 1% de colesterol. Se ha demostrado que tanto las mezclas como los isómeros individuales de ALC reducen las lesiones ateroscleróticas, las lipoproteínas plasmáticas y el estado inflamatorio local (expresión del gen aórtico de COX-2 y de la molécula de adhesión de células vasculares) en conejos, ratones y hámsters (Toomey *et al.*, 2006). En estudios en



humanos, se ha demostrado que el ALC en la dieta mejora los lípidos plasmáticos en sujetos obesos, diabéticos y normolipidémicos, con reducciones obtenidas en triglicéridos (TG) y lipoproteínas de baja densidad, colesterol total y lipoproteínas de muy baja densidad (Chen *et al.*, 2011; Bhattacharya *et al.*, 2006; Moloney *et al.*, 2004; Mougios *et al.*, 2001).

Streptococcus thermophilus es una bacteria termófila con una temperatura de crecimiento óptima de 42°C y un organismo anaerobio tolerante (Gao *et al.*, 2014; Facklam, 2002). Varios estudios recientes realizados en humanos y en animales han demostrado que *S. thermophilus* tiene efectos benéficos a la salud del huésped, como:

Alivio a la intolerancia a la lactosa. La intolerancia a la lactosa es la incapacidad de los adultos y niños para digerir la lactosa del azúcar de la leche, esto se debe a una deficiencia de la enzima β -galactosidasa en el intestino delgado, cuando la β -galactosidasa está presente, la lactosa se hidroliza en sus monosacáridos constituyentes, glucosa y galactosa, que se transportan a través del epitelio del intestino delgado.

Las personas con intolerancia a la lactosa sufren de flatulencias excesivas, dolores abdominales y diarreas. En 2010, la *European Food Safety Authority* (EFSA) otorgó un reclamo de propiedades saludables al yogurt para mejorar la digestión con lactosa, el reclamo fue formulado de la siguiente manera “*Los cultivos de yogurt in vitro mejoran la digestión de la lactosa en el yogurt en personas con mala digestión de la lactosa*” (EFSA, 2010). Esta afirmación se basa en 14 estudios de invención humana, estos estudios han demostrado una digestión mejorada de lactosa por personas con intolerancia a la lactosa al consumir yogurt fresco en comparación con el yogurt pasteurizado con bacterias vivas reducidas o nulas. Para ser considerado un yogurt probiótico debe contener menos 10^8 UFC de microorganismos vivos de *Lb. bulgaricus* y *S. thermophilus* por gramo de producto fermentado, la afirmación se ha atribuido al yogurt que contiene ambas bacterias, pero no a *S. thermophilus* solo (Drouault *et al.*, 2002).



Para comprender mejor el papel específico de *S. thermophilus* en la intolerancia a la lactosa, se han realizado varios estudios en ratones libres de microorganismos patógenos, las células de *S. thermophilus* administradas por vía oral pudieron producir una β -galactosidasa activa en el tracto gastrointestinal (Drouault *et al.*, 2002).

Prevención de la gastritis crónica. Se encontró que la administración de una dosis diaria de leche fermentada por *S. thermophilus* CRL1190 (10^8 UFC / día) administrada durante siete días protege a los ratones contra gastritis inducida por la administración de ácido acetilsalicílico. El efecto gastro-protector se atribuyó claramente al productor de expolisacáridos (EPS) producto por la cepa *S. thermophilus* e igual se indicó que el EPS producido tuvo el mismo efecto que el medicamento Omeprazol utilizado para el tratamiento de la gastritis (Rodríguez *et al.* 2009).

Prevención a la diarrea. La diarrea es una causa grave de mortabilidad infantil que puede ser consecuencia de infecciones virales (rotavirus) o bacterianas en el intestino. Saavedra *et al.*, en el 2009, demostro que la fórmula que combina *Bifidobacterium bifidum* y *S. thermophilus* redujo la incidencia de diarrea asociada a rotavirus en niños de 5 a 24 meses, en un gran estudio en el que participaron 571 niños de entre 3 y 36 meses y se consultó sobre diarrea aguda, se evaluó la eficacia de la administración de cinco preparaciones probióticas diferentes para reducir la duración de la diarrea.

La mezcla de bacterias probióticas incluyendo *S. thermophilus* redujo la diarrea significativamente (70 h) que la solución de rehidratación oral sola (115 h) (Canani *et al.*, 2007).

Una vez caracterizadas las BAL aisladas, se realizaron estudios preeliminares para evaluar las características sensoriales que le confieren a bebidas lacteas fermentadas por lo que se elaborarán siete bebidas lácteas las cuales presentaron excelente aroma, olor a mantequilla, aroma afrutado, a avellana, a yogurt, diacetilo, ácido láctico, a queso, etc., además se modificarón las propiedades reológicas



como la viscosidad, la textura y dieron un producto suave, cremoso, homogéneo que si bien es cierto que algunas presentaron sinéresis y una consistencia líquida (sin agregar ningún tipo de estabilizador), también lo es el hecho de que se necesitan realizar mas estudios que permitan estandarizar las fórmulas de las bebidas lácteas.

A las bebidas se le realizaron pruebas sensoriales utilizando una escala hedónica con 30 panelistas no entrenados entre 18-30 años de edad. Los resultados fueron presentados en la **Tabla 12**, en los que se indica una alta aceptación en relación al aroma de la bebida láctea, los resultados se presentan parcialmente ya que como se mencionó con anterioridad se requieren de más estudios que completen estos resultados.

Finalmente la contribución de este proyecto a la sociedad consiste en ofrecer bebidas lácteas fermentadas a partir de las bacterias que forman parte del microbioma de *Ulomoides dermestoides* (gorgojos chinos) que ayuden en el control de enfermedades como la *Diabetes mellitus* tipo 2 o alguna otra enfermedad relacionada con síndrome metabólico.



9. Conclusiones.

Se aislaron, purificaron, caracterizaron y conservaron diez bacterias ácido lácticas con actividad probiótica a partir del gorgojo chino las cuales de acuerdo a reportes emitidos en la literatura y dependiendo del género y de la especie se caracterizan por tener propiedades benéficas en la salud de los consumidores, por lo que, junto con las benzoquinonas, crotoxinas, pentadecenos, hidroquinonas, terpenos, ácidos graso, colesterol y ésteres producidas por los gorgojos chinos como mecanismo de defensa al pH ácido de los jugos gástricos, posiblemente se potencie el efecto benéfico que les atribuyen los consumidores.

Se prepararon bebidas lácteas, con características adecuadas para elaborar diferentes tipos de yogures, batido y bebible, cuyo grado de aceptación (aroma, consistencia y textura) por el grupo de panelistas no entrenados fue altamente aceptable.

PERSPECTIVAS

Las bacterias ácido-lácticas aisladas y purificadas pudieran ser utilizadas en la elaboración de nuevos alimentos nutracéuticos ya que al ser cepas nativas con propiedades benéficas iguales o mejores a las reportadas en la literatura, sería interesante continuar desarrollando productos con propiedades probióticas utilizando estas cepas.



10. Referencias Bibliográficas.

- [1] Abriouel H, Franz CMAP, Omar NB y Gálvez A (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *Federation of European Microbiological Reviews*, 35(1): 201-232.
- [2] Masso-Welch, Zangani DC, Vaughan MM, Shoemaker SF, McGee SO y Ip MM (2004). Isomers of conjugated linoleic acid differ in their effects on angiogenesis and survival of mouse mammary adipose vasculature. *Journal of Nutrition*, 134(2): 299-307.
- [3] Adams MR y Moss MO. Food Microbiology, 2nd Edition. *The Royal Society of Chemistry, Cambridge University Press*: London, UK (1999), pp: 390-392.
- [4] Alais C. Ciencia de la Leche. *Editorial CECSA*: México (1981).
- [5] Alquicira L. Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría. *Universidad Autónoma Metropolitana*, México (2006).
- [6] Alvarado RC, Chacón RZ, Otoniel RJ, Guerrero CB y López CG (2017). Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias ácido lácticas de un queso venezolano ahumado andino artesanal y su uso como cultivo iniciador. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 17(3): 301-308.
- [7] Amores R, Calvo LR, Maestre y Martínez HD (2004). Probióticos. *Revista española de Quimioterapia, Proas Science S.A*, 17(2): 131-139.
- [8] Association of official Agricultural Chemists (2000).
- [9] Ardila PDA (2014). El ácido láctico como biomarcador en los errores innatos del metabolismo, breve reseña. *Revista Semilleros Med.*, 8(1): 130-132.
- [10] Atkinson RL. Conjugated linoleic acid for altering body composition and treating obesity. Yuraweez M, Mossoba M, Kramer J, Pariza M, Nelson G (Editores), Advances in conjugated linoleic acid research, Vol. 1. *American Oil Chemists' Society Press*, Champaign, Illinois (1999), pp: 348-353
- [11] Axelsson LT. Lactic acid bacteria: classification and physiology; In Advance in Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Salminen S, Von



- Wright A y Ouweland A (Editores). *Editorial Marcel Dekker*. New York (2004), pp: 1-66.
- [12] Aymerich T, Garriga M, Ylla J, Vallier J, Monfort JM y Hugs M (2000). Application of enterocins as biopreservatives against *Listeria innocua* in meat products. *Journal of Food Protection*, 63: 721-126.
- [13] Barboza JE, Vázquez H, Salcedo R y Bautista M (2004). Probióticos y conservadores naturales en alimentos. *Acta Universitaria*, 14(3): 32-38.
- [14] Belury MA (2002). Dietary conjugated linoleic acid in health: Physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, 22(1): 505-531.
- [15] Bengmark S y Gil Á (2006). Control bioecológico y nutricional de la enfermedad: prebióticos, probióticos y simbióticos. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 21: 73-86.
- [16] Beshkova D y Frengova G (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*, 12(4): 1-14.
- [17] Bhattacharya A, Rahman MM, McCarter R, O'Shea M y Fernandes G (2006). Conjugated linoleic acid and chromium lower body weight and visceral fat mass in high-fat-diet-fed mice. *Lipids*, 41(5): 437-444.
- [18] Bosch GM, Espadaler MJ, Méndez SM, Pérez CM, Farrán CA, Audiart BS, Bonachera SMA y Cuñe CJ (2011). El consumo del probiótico *Lactobacillus plantarum* CET7315/7316 mejora el estado de salud general en personas de edad avanzada. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 26(3): 642-645.
- [19] Boucher I, Vadeboncoeur C y Moineau S (2003). Characterization of genes involved in the metabolism of α -galactosides by *Lactococcus raffinolactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(7): 4049-4056.
- [20] Bozoglu TF y Ray B. Lactic Acid Bacteria: Current Advances in Metabolism, Genetics and Applications. *Editorial Springer*. Germany, Berlin (1996), pp: 155-203.
- [21] Canani RB, Cirillo P, Terrin G, Cesarano L, Spagnuolo MI, De Vincenzo A y Guarino A (2007). Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children:



- Randomised clinical trial of five different preparations. *The BMJ: leading general medical journal*, 335(7615): 340.
- [22] Charumati M y Lambert J (1996). Production of anti-microbial substances by probiotics. *Asia Pacific Journal Clinic Nutrition*, 5: 20-24.
- [23] Chen Z, Ma K, Liang Y, Peng C y Zuo Y (2011). Role and classification of cholesterol-lowering functional foods. *Journal of Functional Foods*, 3(2): 61-69.
- [24] Chen H y Hoover DG (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2: 82-100.
- [25] Chevrolat LAA (1878). Diagnoses de diptérides nouveaux. *Petites Nouvelles Entomologiques*, 2: 1-242.
- [26] Chu G, Palmieri J y Sullivan J (1997). Beetle eating: A Malaysia folk medical practice and its public health implications. *Tropical Geography Medicine*, 29(4): 422-427.
- [27] Chua T y Chandrepal R (1978). The influence of restricted food on development of larve and the fecundity of *Palembus dermestoides* Fairn (*Tenebrionidae*). *Journal of Stored Products Research*, 14: 2-3.
- [28] Cintas LM, Casaus MP, Herranz C, Nes IF y Hernández PE (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. *Food Science Technology International*, 7(4): 281-305.
- [29] Cleveland J, Monteville TJ, Nes IF y Chikindas ML (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71(1): 1-20.
- [30] Coakley M, Johnson MC, McGrath E, Rahman S, Ross RP, Fitzgerald GF, D every R y Stanton C (2006). Intestinal bifidobacteria that produce *trans*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid: A fatty acid with antiproliferative activity against human colon SW480 and HT-29 cancer cells. *Nutrition and Cancer – An International Journal*, 56(1): 95-102.
- [31] Costa NEM, Ramos EJ y Pino JM (2006). Los insectos medicinales de Brasil: primeros resultados. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 38: 395-414.



- [32] Cotter PD, Hill C y Roos RP (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3(10): 777-788.
- [33] Crespo R, Villaverde ML, Girotti JR, Güerci A, Juárez MP y G. de Bravo M (2011). Cytotoxic and genotoxic effects of defence secretion of *Ulomoides dermestoides* on A549 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 136(1): 204-209.
- [34] Daneysa LK, Rute W, Ademir M, Cleonice MPS, Luciane MC y Eliane C (2015). Characterization of the spoilage lactic acid bacteria in "sliced vacuum-packed cooked ham". *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(1): 173-181.
- [35] Davidson PM y Hoover DG. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. Salminen S y Von Wright A (Editores). *Editorial Marcel Dekker: New York* (1993), pp: 127-150.
- [36] Davis CD y Milner JA (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10): 743-752.
- [37] De La Torre A, Juanéda P, Durand D, Chardigny JM, Barthomeuf CD y Bauchart DG (2006). Beef conjugated linoleic acid isomers reduce human cancer cell growth even when associated with other beef fatty acids. *The British Journal of Nutrition*, 95(2): 346-352.
- [38] Degen C, Ecker J, Piegholdt S, Liebisch G, Schmitz G y Jahreis G (2011). Metabolic and growth inhibitory effects of conjugated fatty acids in the cell line HT-29 with special regard to the conversion of t11, t13-CLA. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1811(12): 1070-1080.
- [39] Deloya-Brito GG y Deloya C (2014). Sustancias producidas por el coleóptero *Ulomoides dermestoides* (Chevrolat, 1878) (*Tenebrionidae*, *Coleptera*): efecto anti-inflamatorio y citotóxico. *Acta Zoológica Mexicana*, 30(3): 655-661.
- [40] Delves BJ (2005). Nisin as a food preservative. *Food Australia*, 57(12): 525-527.
- [41] Diaz FJ, Parra V, Bendaño T, Montes P y Solorzano P (2012). Utilidad del suplemento de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* y *bulgaricus*) en el tratamiento del Síndrome de Intestino Irritable. *Revista de Gastroenterología de Perú*, 32(4): 387-393.



- [42] Dimov SG, Ivanova PM, Harizanova NT e Ivanova IV (2005). Bioactive peptides used by bacteria in the concurrence for ecological niche: general classification and mode of action (overview). *Biotechnological Equipment*, (2): 3-22.
- [43] Drouault S, Anba J y Corthier G (2002). *Streptococcus thermophilus* is able to produce a -galactosidase active during its transit in the digestive tract of germfree mice. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 938-941.
- [44] Du L, Somkuti J, Renye J y Huo G (2011). Properties of duracin GI, a new antilisterial bacteriocin produced by *Enterococcus durans* 41D. *Journal of Food Safety*, 32: 74-83.
- [45] Dubey V, Ghosh AR, Bishayee K y Khuda BAR (2015). Probiotic *Pediococcus pentosaceus* strain G54 alleviates azoxymethane-induced toxicity in mice. *Nutrition Research*, 35(10): 921-924.
- [46] Ekbal M, Ibrahim A y Elbarbary HA (2012). Effect of bacteriocin extracted from *Lactobacillus acidophilus* on the shelf-life of pasteurized milk. *Journal of American Science*, 8(2): 620-626.
- [47] El Roz A, Bard JM, Huvelin JM y Nazih H (2013). The anti-proliferative and pro-apoptotic effects of the *trans*9, *trans*11 conjugated linoleic acid isomer on MCF-7 breast cancer cells are associated with LXR activation. *Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids*, 88(4): 265-272.
- [48] Elmer GW, Surawics CM y McFarland LV (1996). Biotherapeutic Agents: A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *Journal of the American Medical Association*, 275(11): 870-876.
- [49] Estévez CMM, Pablo PSS, Meléndez CME, Salazar GA, Campuzano MJR, Olvera ALA, Camacho VA y Enríquez HRG. Chemical and Pharmacological study of natural products medicinal plants and *Ulomoides dermestoides*. Proyecto de investigación. *Instituto Politécnico Nacional, México* (2017).
- [50] Facklam R (2002). What happened to the *streptococci*: Overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4): 613-630.



- [51] Food and Agriculture Organization of the United Nations/ Organización Mundial de la Salud (2006).
- [52] Farnworth ER (2008). The Evidence to Support Health Claims of Probiotics. *Journal of Nutrition*, 138(6): 12505-12545.
- [53] Ferrer J (1988). Svartbaggen *Martianus dermestoides* (Chevrolat 1878) funnen i Skåne. *Entomologiska tidskrift Journal*, 109(1): 48.
- [54] Flowers M y Thompson PA. t10, c12 conjugated linoleic acid suppresses HER2 protein and enhances apoptosis in SKBr3 breast cancer cells: Possible role of COX2. *PLoS ONE*, 4(4): e5342.
- [55] Fox PF, Guinee TP, Cogan TM y McSweeney PLH. Fundamentals of cheese science. *Editorial Springer US: USA 2000*, pp: 102.
- [56] Fuller R (1989). Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, 66(5): 365-378.
- [57] Gao XY, Zhi XY, Li HW, Klenk HP y Li WJ (2014). Comparative genomics of the bacterial genus streptococcus illuminates evolutionary implications of species groups. *PLoS ONE journal*, 9(6): 101-229.
- [58] Garcés MAM, Arango GGP y Gómez FT (2009). Cría de *Ulomoides dermestoides*, coleoptera: tenebrionodae, en tres tipos de sustrato. *Revista lasallista de investigación*, 6(2): 64-68.
- [59] García M, Revah S y Gómez L. Productos lácteos; En Biotecnología Alimentaria. García GM, Quintero RR, Agustín LMC (Editores). *Editorial Limusa Noriega: México, D.F (1998)*, pp: 163-178.
- [60] Goldin BR, Swenson L, Dwyer J, Sexton M y Gorbach SL (1980). Effect of diet and *Lactobacillus acidophilus* supplements on human fecal bacterial enzymes. *Journal of the National Cancer Institute*, 64(2): 255-261.
- [61] González MBE, Gómez TM y Jiménez SZ (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4: 10-20.
- [62] González TF, González AB, Guerrero IL y Zamudio MM. Evaluación de la actividad probiótica *in vitro* de bacterias lácticas aisladas de alimentos tradicionales de Yucatán. *Universidad Autónoma de Yucatán, México 2004*.



- [63] Grande M, Abriouel H, López R, Valdivia E, Nabil B, Martínez CM y Gálvez A (2007). Efficacy of enterocin AS-48 against Bacilli in ready-to-eat vegetable soups and purees. *Journal of Food Protection*, 70: 2339-2345.
- [64] Greene JD y Klaenhammer TR (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied Environmental Microbiology*, 60: 4487-4494.
- [65] Guililand SE (1990). Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 87: 175-188.
- [66] Guililand SE, Nelson CR y Maxwell C (1995). Assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile-salt deconjugating activity. *Applied Environmental Microbiology*, 5(21): 149-151.
- [67] Gupta V y Garg R (2009). Probiotics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 27(3): 202-209.
- [68] Hamilton MJM (2003). The role of probiotics in the treatment and prevention of Helicobacter pylori infection. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(4): 360-366.
- [69] Hassan M, Kjos M, Diep DB y Lotfipour F (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 1: 1-14.
- [70] Hernandez AAM, Wachter C, Llamas M, Lopez GP y Perez CM (2018). Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. *Food Science and Technology*, 91: 249-257.
- [71] Heyman MB (2006). Intolerancia a la lactosa en bebés, niños y adolescentes. *Journal of Pediatrics*, 118(3): 1279-1286.
- [72] Hwang DM, Kundu JK, Shin JW, Lee JC y Surh YJ (2007). *cis*-9, *trans*-11-conjugated linoleic acid down-regulates phorbol ester-induced NF-kappaB activation and subsequent COX-2 expression in hairless mouse skin by targeting I-kappaB kinase and PI3K-Akt. *Carcinogenesis*, 28(2): 363-371.



- [73] Instituto mexicano para la Competitividad, A.C. Kilos de más, pesos de menos: los costos de la obesidad en México. URL: http://imco.org.mx/wp-content/uploads/2015/01/20150127_ObesidadEnMexico_DocumentoCompleto.pdf (Consultado el 01 de octubre de (2018)).
- [74] Jay JM. Microbiología Moderna de los Alimentos, 4^{ta} Edición. *Editorial Acribia Zaragoza*: España (2000), pp: 156.
- [75] Jeevaratnam K, Jamuna M y Bawa AS (2005). Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4: 446-454.
- [76] Jiang T, Mustpha A y Salviano DA (1996). Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Science*, 79: 750-757.
- [77] Juneja KV y Sofos NJ. Control of microorganisms with chemicals: In Control of foodborne microorganisms. *Editorial Marcel Dekker*: New York (2002), pp: 166-172.
- [78] Kandler O y Weiss N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. Sneath PHA, Mair MS, Sharp Me y Holt JG (Editores). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 10th edition, Vol. 2. *The Williams and Wilkins Co*: Baltimore (1992).
- [79] Katla T, Moretro T, Sveen I, Aasen I, Axelsson L, Rorvik L y Naterstad K (2002). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in chicken cold cuts by addition of sakacin P and sakacin P- producing *Lactobacillus sakei*. *Journal Applied Microbiology*, 93(2): 191-196.
- [80] Kelley NS, Hubbard NE y Erickson KL (2007). Conjugated linoleic acid isomers and cancer. *Journal of Nutrition*, 137(12): 2599-2607.
- [81] Kim JH, Pan JH, Park HG, Yoon HG, Kwon OJ, Kim TW, Shin DH y Kim YJ (2010). Functional comparison of esterified and free forms of conjugated linoleic acid in high-fat-diet-induced obese C57BL/6J mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21): 1141-1147.



- [82] Klaver FAM y Van der Meer R (1993). The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile-salt econjugating activity. *Applied Environmental Microbiology*, 59: 1120-1124.
- [83] Kriton K (2008). El escarabajo del asma y su empleo en la medicina tradicional. *Reptilia Journal*, 70: 34-42.
- [84] Labayen I y Martínez JA (2003). Bacterias probióticas y deficiencia de lactasa. *Elsevier*, 26(1): 1-84.
- [85] Laurencio SM, Arteaga F, Rondón CAJ, Pinto J, Pazmiño D y Macías I (2017). Potencial probiótico in vitro de cepas de *Lactobacillus spp.* procedentes de la vagina de vacas lecheras. *Revista pastos y forrajes*, 40(3): 192-201.
- [86] Le Leu RK, Hu Y, Brown IL, Woodman RJ y Young GP (2010). Synbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch prtects against colorectal cancer development in rats. *Carcinogenesis Journal*, 31(2): 246-251.
- [87] Levau JY y Bouix M. Microbiología industrial, los microorganismos de interés industrial; Taxonomía y ecología: Los diferentes géneros de bacterias lácticas. *Editorial Acribia, Zaragoza: España (2000)*, pp: 167-206.
- [88] Liong MT (2008). Roles of Probiotics and Prebiotics in colon cancer prevention: Postulated mechanisms and In-vivo Evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 854-863.
- [89] Londoño L. Ciclo biológico del *Palembus dermestoides (Tenebrionidae, Coleoptera)*, en condiciones de laboratorio. Tesis de Posgrado. *Universidad de Antioquia, Departamento de biología. Medellín, Colombia (1992)*.
- [90] Liu Y, Zhang C, Zhao L y Nardini C (2010). Adapting functional genomic tools to metagenomic analyses: investigating the role of gut bacteria in relation to obesity. *Briefings in Functional Genomics*, 9(5): 355-361.
- [91] Manzano AC, Estupiñán GD y Poveda EE (2012). Efectos clínicos de los probióticos: Qué dice la evidencia. *Revista chilena de nutrición*, 39(1): 98-110.
- [92] Mattick ATR y Hirsh A (1947). Further observations on an inhibitory substance (nisin) from *lactic streptococci*. *Lancet Journal*, 2: 5-7.



- [93] McAuliffe O, Ross RP y Hill C (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 25(3): 285-308.
- [94] Meza GJC. Perservación de la inocuidad microbiana del requesón mediante la incorporación de bacterias lácticas seleccionadas. Tesis de maestría en ciencia y tecnología de los alimentos. *Universidad Autónoma de Querétaro*. Querétaro, México (1999).
- [95] Milena VMS, Suárez MH y Zapata BS (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36(1): 64-71.
- [96] Molinaro F, Paschetta E, Cassader M, Gambino R y Musso G (2012). Probiotics, Prebiotics, Energy Balance, and Obesity: Mechanistic Insights and Therapeutic Implications. *Gastroenterology Clinics of North America*, 41(4): 843-854.
- [97] Moloney F, Yeow TP, Mullen A, Nolan JJ, Roche HM (2004). Conjugated linoleic acid supplementation, insulin sensitivity, and lipoprotein metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(4): 887-895.
- [98] Montalbán LM, Sánchez HM, Valdivia E, Martínez BM y Maqueda M (2011). Are bacteriocins underexploited? Novel applications for old antimicrobials. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 12(8): 1205-1220.
- [99] Moon H, Lee H, Seo J, Chung C, Kim T, Choi Y y Cho C (2009). Antiobesity effect of PEGylated conjugated linoleic acid on high-fat diet-induced obese C57BL/6J (ob/ob) mice: Attenuation of insulin resistance and enhancement of antioxidant defenses. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(3): 187-194.
- [100] Moreno ALA, Cevera RP, Ortega ARM, Díaz MJJ, Baladía E, Basulto J, Bel SS, Iglesia AI, López SAM, Manera M, Rodríguez RE, Santaliestra PAM, Babio N y Salas SJ (2013). Evidencia científica sobre el papel del yogur y otras leches fermentadas en la alimentación saludable de la población española. *Revista Nutrición Hospitalaria*, 28(6): 2039-2089.



- [101] Morgan SM, Roos RP, Baresford T y Hill C (2000). Combination of hydrostatic pressure and lactacin 3147 causes increased killing of *Staphylococcus* and *Listeria*. *Journal of Applied Microbiology*, 88: 414-420.
- [102] Mougios V, Matsakas A, Petridou A, Ring S, Sagredos A, Melissopoulou A, Tsigilis N y Nikolaidis M (2001). Effect of supplementation with conjugated linoleic acid on human serum lipids and body fat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12(10): 585-594.
- [103] Naudi AS, Unal R y Tulpinski J (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. En: Shetty K, Paliyath G, Pometto A y Levin RE. (Editores). *Food Biotechnology, 2da Edición, CRC Press*. Boca Raton, Florida, pp: 1391-1437.
- [104] Narayan SS, Jalgaonkar S, Shahani S y Kulkarni VN (2010). Probiotics: Current trend in the treatment of diarrhoea. *Hong Kong Med Journal*, 16(3): 2013-2018.
- [105] Naudi AS, Biblack WR y Clemens RA (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38: 126.
- [106] Nes IF, Yoon SS y Diep DB (2007). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides (bacteriocins) in lactic acid bacteria: a review. *Food Science Biotechnology*, 16(5): 657-690.
- [107] Nes IF, Diep DB, Havarstein LS, Mi Brurberg, Eijsink V y Holo H (1996). Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 70(2): 113-128.
- [108] NOM-121-SSA1-1994. Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.
- [109] Ochoa JJ, Farquharson AJ, Grant I, Moffat LE, Heys SD y Wahle KWJ (2004). Conjugated linoleic acids (CLAs) decrease prostate cancer cell proliferation: Different molecular mechanisms for *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 isomers. *Carcinogenesis*, 25(7): 1185-1191.
- [110] Ogueke CC, Owuamanam CI, Ihediohanma NC y Iwouno JO (2010). Probiotics and Prebiotics. Unfolding Prospects for Better Human Health. *Parkinson Journal of Dairy Science*. 93(11): 5048-5058.



- [111] Oppegård C, Rogne P, Emanuelsen L, Kristiansen PE, Fimland G y Nissen MJ (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4): 2010-219.
- [112] Organización Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la salud. Manejo integrado de las enfermedades crónicas y sus factores de riesgo. URL: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1543:2012-integrated-disease-management&Itemid=1353&lang=es (Consultado el 01 de octubre de 2018).
- [113] Orla-Jensen S (1919). The lactic acid bacteria. *Mémoires de l'Académie Royale Science; Demark Section Science*, 8(5): 181-196.
- [114] Ouwehand AC. Lactic Acid Bacteria: Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria. Salminen S y Von Wright A. (Editores). *Editorial Marcel Dekker*. New York (1993), pp: 139-159.
- [115] Owen RF, Hui YH, Marcus K, Pieter W y John RW. Lactic Acid Bacteria: Food Science and Technology, a series of Monographs, Textbooks, and Reference Books. *Editorial Board*, New York (2004), pp: 23-30.
- [116] Pagasa CEM, González IMS, Pacheco ORM y Pulido MT (2006). Importancia cultural, en función del uso, de cinco especies antrópodos en Tlacuilotepec, Puebla, México. *Sitientibus, Serie Ciencias Biológicas (Etnobiología)*, 6: 65-71.
- [117] Parada R, Beraud L, Andoro D, Sosa F, Marguet E y Vallejo M (2017). Actividad antimicrobiana de bacterias ácido lácticas aisladas de invertebrados marinos de la costa del Chubut (Patagonia-Argentina). *Revista Bionatura*, 2(4): 456-459.
- [118] Parra HRA (2010). Review: Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Revista de la Facultad de Ciencias Agropecuarias*, 8(1): 93-105.
- [119] Parra HRA (2012). Yogur en la salud humana. *Revista Lasallista de Investigación*, 9(2): 162-177.
- [120] Passerat B y Desmaison AM (1995). Lactase activity of *Bifidobacterium bifidum*. *Nutrition Research*, 15(9): 1287-1295.



- [121] Penedo LA, Nunes JC, Gama MAS, Leite PEC, Quirico STF y Torres AG (2013). Intake of butter naturally enriched with *cis-9-trans-11* conjugated linoleic acid reduces systemic inflammatory mediators in healthy young adults. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24: 2144-2151.
- [122] Pereda AA, Vega ALS y Mota de la Garza L (1990). Identificación de bacterias lácticas de interés industrial mediante micrométodos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 32: 24-29.
- [123] Pérez MJA, Vázquez MJR, Rodríguez SMC, Miranda MRE, Romo GAL y Nader GE. Procedimientos de laboratorio para bacteriología y micología veterinarias. *Universidad Nacional Autónoma de México* (1987), pp: 8-16.
- [124] Piper EL y Leyva KJ (2009). Growth inhibition of gastrointestinal strains of *Escherichia coli* by *Lactobacillus* species. *Journal of the Arizona Nevada Academy of Science*, 41(2): 49-54
- [125] Pricilia HCY, Hernández MA, Arón GCF y Vallejo CB (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Revista Interciencia*, 42(6): 340-346.
- [126] Quintero BS (2006). Incorporación de la pediocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK133 en películas y recubrimientos comestibles. Tesis de Doctorado. *Universidad Autónoma Metropolitana*, México, pp: 111.
- [127] Rakib MA, Lee WS, Kim GS, Han JH, Kim JO y Ha YL (2013). Antiproliferative action of conjugated linoleic acid on human MCF-7 breast cancer cells mediated by enhancement of gap junctional intercellular communication through inactivation of NF- κ B. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 15: 314-325.
- [128] Ramos EJ (2004). Biodiversidad, taxonomía y bibliografía de antrópodos de México, hacia una síntesis de su conocimiento: La etnoentomología en la alimentación, la medicina y el reciclaje. Bousquets LJE, Morrone JJ, Ordóñez YO and Fernández VI (Editores). *UNAM Conabio. México*, 1(4): 329-413.
- [129] Ray B. Probiotics of lactic acid bacteria: Science or myth? . *Lactic acid bacteria, current advances in metabolism, genetic and applications*, Germany (1996), pp: 100-135.



- [130] Reid G, Jass J, Sebulski MT y McCormick JK (2003). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 16: 658-672.
- [131] Riley MA y Wertz JE (2002) Bacteriocins: evolution, ecology and applications. *Annual Review of Microbiology*, 56: 117-137.
- [132] Robles AV y Guarner F (2013). Linking the gut microbiota to human health. *British Journal of Nutrition*, 109: S21-S26.
- [133] Rodríguez C, Medici M, Rodríguez AV, Mozzi F y Font de Valdez G (2009). Prevention of chronic gastritis by fermented milks made with exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* strains. *Journal of Dairy Science*, 92(6): 2423–2434.
- [134] Ros E (2000). Intestinal absorption of triglyceride and cholesterol: Dietary and pharmacological inhibition to reduce cardiovascular risk. *Atherosclerosis journal*, 151: 357-79.
- [135] Rosberg CE, Stanton C, O'Mahony, Wall R, Shanahan F, Quigley EM, Fitzgerald GF y Ross RP (2011). Recombinant *Lactobacilli* expressing linoleic acid isomerase can modulate the fatty acid composition of host adipose tissue in mice. *Microbiology-SGM*, 157: 609-615.
- [136] Saavedra JM, Abi HA, Moore N y Yolken RH (2004). Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(2): 261–267.
- [137] Saavedra JM, Baunman NA, Oung Y, Perman JA y Yolken RH (1994). Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *The lancet journal*, 344: 1046-1049.
- [138] Samaržija D, Antunac N y Havranek JL (2001). Taxonomía, fisiología y crecimiento de *Lactococcus lactis*: una revisión. *Mljekarstvo journal*, 51: 35-48.
- [139] Sanders ME (2000). Considerations for use of probiotic bacteria to modulate human health. *Journal of Nutrition*, 130: 3845-3905.
- [140] Santos RC, Lunardelli A, Caberlon E, Bastos CM, Nunes FB, Pires MG, Boilchi V, Paul EL, Viera FB, Aquino RCA y Corseuil E de Olivera JR (2010). Anti-



- inflammatory and immunomodulatory effects of *Ulomoides dermestoides* on induced pleurisy in rats and lymphoproliferation *in vitro*. *Reviews Inflammation Springer*, 33(6): 173-179.
- [141] Savadogo A, Ouattara AT, Bassole HN y Traore SA (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria - a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9): 678-683.
- [142] Shillinger U y Lücke FK (1989). Identification of lactobacilli from meat and meat products. *Food Microbiology*, (4): 199-208.
- [143] Servin A (2004). Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *Federation of European Microbiological Societies Microbiology Reviews*, 28: 405-410.
- [144] Settanni L y Corsetti A (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 123-138.
- [145] Shen W, Chuang CC, Martinez K, Reid T, Brown JM, Xi L, Hixson L, Hopkins R, Starnes J y McIntosh M (2013). Conjugated linoleic acid reduces adiposity and increases markers of browning and inflammation in white adipose tissue of mice. *Journal of Lipid Research*, 54(4): 909-922.
- [146] Shin JM, Gwak JW, Kamarajan P, Fenno JC, Rickard AH y Kapila YL (2016). Biomedical applications of nisin. *Journal of Applied Microbiology*, 120(6): 1449-1465.
- [147] Shirai K, Guerrero I y Lara P (1996). Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Revista Ciencia*, 47:125-137.
- [148] Soomro AH, Masud T y Anwaar K (2004). Food Preservation and Human Health-A Review: Role of Lactic Acid Bacteria (LAB). *Pakistan journal of Nutrition*, 1(1): 20-24.
- [149] Spilman TJ. Insects and mite pest of food, an illustrated key: Darkling beetles (*Tenebrionidae*, *Coleoptera*). Gorham JR (Editor). *United States Department of Agriculture: Washington, D.C* (1987), pp: 185-214.
- [150] Stiles ME y Holzapfel WH (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, 36: 1-29.



- [151] Stoyanova LG, Ustyugova EA y Netrusov AI (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 48(3): 229-243.
- [152] Šuškovič J, Kos B, Beganovič J, Leboš A, Habjanič K y Matošić S (2010). Antimicrobial activity -the most important property of prebiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*, 48(3): 296-307.
- [153] Téllez MAL. Estudio del potencial probiótico de la cepa de *Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides* BL-UV04. Tesis de Maestría. *Universidad Veracruzana Instituto de ciencias básicas*. Xalapa, Veracruz, (2017).
- [154] Tahri K, Ballongue J y Schneider F (1995). Effects of three strains of bifidobacteria on cholesterol. *Letters Applied Microbiology*, 21: 149-51.
- [155] Tóbon FA, Gutiérrez ZGP y Mejía GML (2011). Evaluación del perfil neurofarmacológico del aceite de *Ulomoides dermestoides* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Revista Colombiana de Etmología*, 32(2): 251-255.
- [156] Toomey S, Harhen B, Roche HM, Fitzgerald D y Belton O (2006). Profound resolution of early atherosclerosis with conjugated linoleic acid. *Atherosclerosis*, 187(1): 40-49.
- [157] Tricon S, Burdge GC, Kew S, Banerjee T, Russell JJ, Grimble RF, Williams CM, Calder PC y Yaqoob P (2004). Effects of *cis*-9, *trans*-11 and *trans*-10, *cis*-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(6): 1626-1633.
- [158] Turgay EO, Cetil O y Ergün O (2002). A study on metabolic and antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* isolated from fermented sausage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5(5): 594-596.
- [159] Villani F, Salzano G, Sorrentino E, Pepe O, Marino P y Coppola S (1993). Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 74:380-387.
- [160] Varcoe JJ, Krejcarek G, Busta F y Brady L (2003). Prophylactic feeding of *Lactobacillus acidophilus* NCFM to mice attenuates overt colonic hyperplasia. *Journal of Food Protection*, 66: 457-65.



- [161] Veisseyre R. Lactología técnica, 3^{ra} Edición. *Editorial Acribia S.A. Zaragoza: España* (1990).
- [162] Vidhyasagar V y Jeevaratnam K (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. *Journal of Functional Foods*, 5(1): 235-243.
- [163] Vieira CP, Cabral CC, Da Costa Lima BRC, Paschoalin VMF, Leandro KC y Conte Jr.CA (2017). *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* MRS47, a potential probiotic strain isolated from kefir grains, increases *cis*-9, *trans*-11-CLA and PUFA contents in fermented milk. *Journal of Functional Foods*, 31: 172-178.
- [164] Wagner RD, Pierson C y Warner T (1997). Biotherapeutic effects of probiotic bacteria on candidiasis in immunodeficient mice. *Infect Immun journal*, 65: 4165-4172.
- [165] Wahrendorf MS y Wink M (2006). Pharmacologically active natural products in the defence secretion of *Palembus ocularis* (Tenebrionidae, Coleoptera). *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1): 51-56.
- [166] West DB, Blohm FY, Truett AA y DeLany JP (2000). Conjugated linoleic acid persistently increases total energy expenditure in AKR/J mice without increasing uncoupling protein gene expression. *Journal of Nutrition*, 130(10): 2471-2477.
- [167] Wood BJB y Holzapfel WH. The genera of lactic acid bacteria. 1^a Edition. Blackie Academic & Profesional. *Editorial Springer US: USA* (1995), pp: 1-12.
- [168] Wu CW, Yin LJ y Jiang ST (2004). Purification and characterization of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1146-1151.
- [169] Yang B, Chen H, Stanton C, Ross RP, Zhang H, Chen YQ y Chen W (2015). Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. *Journal of Functional Foods*, 15: 314-325.
- [170] Yasui H, Kiyoshima J y Ushijima H (1995). Passive protection against Rotavirus-induced Diarrhoea of Mouse pups Born to Nursed by Dams Fed *Bifidobacterium breve* YIT4064. *The Journal of Infectious Diseases*, 172: 403-409.



[171] Zouhir A, Hammami R, Fliss I y Hamida JB (2010). A new structure-based classification of Gram-positive bacteriocins. *Protein Journal*, 29(6): 432-439.

11. Anexos.

Tabla A. Características diferenciales de las bacterias ácido lácticas

Carácter	Bacilos		Cocos							
	<i>Carnob.</i>	<i>Lactob.</i>	<i>Aeroc.</i>	<i>Enteroc.</i>	<i>Lactoc.</i> <i>Vagoc.</i>	<i>Leucon.</i> <i>Oenoc.</i>	<i>Pedioc.</i>	<i>Streptoc.</i>	<i>Tetragenoc.</i>	<i>Weissella.</i>
Formación de tétradas	—	—	+	—	—	—	+	—	+	—
CO ₂ a partir de glucosa	—	±	—	—	—	+	—	—	—	+
Crecimiento a 10°C	+	±	+	+	+	+	±	—	+	+
Crecimiento a 45°C	—	±	—	+	—	—	±	±	—	—
Crecimiento en 6.5% NaCl	ND	±	+	+	—	±	±	—	+	±
Crecimiento en 18% NaCl	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
Crecimiento a pH 4.4	ND	±	—	+	±	±	+	—	—	±
Crecimiento a pH 9.6	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—

+: positivo, —: negativo, ±: la respuesta varia la especie, ND: No determinado.

(Axelsson *et al.* 2004.)



Tabla B. Sustratos contenidos en la galería API 50 CHL.

Tubo	Ensayo	Sustrato	Tubo	Ensayo	Sustrato
0		Control negativo	25	ESC	Esculina y citrato férrico
1	GLY	Glicerol	26	SAL	Salicina
2	ERY	Eritrirol	27	CEL	D-Celobiosa
3	DARA	D-ARabinosa	28	MAL	D-Maltosa
4	LARA	L-Arabinosa	29	LAC	D-Lactosa
5	RIB	D-Ribosa	30	MEL	D-Melibiosa
6	DXYL	D-Xilosa	31	SAC	D-Sacarosa
7	LXY	L-Xilosa	32	TRE	D-Trehalosa
8	ADO	D-Adonitol	33	INU	Inulina
9	MDX	Metil- β D- Xilopiranosida	34	MLZ	D-Melezitosa
10	GAL	D-Galactosa	35	RAF	D-Rafinosa
11	GLU	D-Glucosa	36	AMD	Almidón
12	FRU	D-Fructosa	37	GLY	Glicógeno
13	MNE	D-Mamnosa	38	XLT	Xilitol
14	SBE	L- Sorbosa	39	GEN	Gentibiosa
15	RHA	L-Rhamnosa	40	TUR	D-Turanosa
16	DUL	Dulcitol	41	LYX	D-Lixosa
17	INO	Inositol	42	TAG	D-Tagatosa
18	MAN	D-Manitol	43	DFUC	D-Fucosa
19	SOR	D-Sorbitol	44	LFUC	L-Fucosa
20	MDM	Metil- α D-Manopiranosida	45	DARL	D-Arabitol
21	MDG	Metil- α D-Glucopiranosida	46	LARL	L-Arabitol
22	NAG	N-Acetilglucasamina	47	GNT	Gluconato potásico
23	AMY	Amigdalina	48	2KG	2-Cetogluconato potásico
24	ARB	Arbutina	49	5KG	5-Cetogluconato potásico

Tabla C. Identificación API 20 Strep.

TESTS	COMPONENTES ACTIVOS	REACCIONES/ENZIMAS	RESULTADOS			
			NEGATIVO		POSITIVO	
VP	Piruvato sódico	Producción de acetona (Voges Proskauer)	VP 1 + VP 2 / hasta 10 min. (3)			
			Incoloro		Rosa-Rojizo	
HIP	Ácido hipúrico	Hidrólisis (ácido Hipurico)	NIN / hasta 10 min.			
			Incolor/Azul pálido Gris azulado		Azul oscuro /Violeta	
ESC	Esculina y Citrato de hierro	Hidrólisis β-glucosidasa (Esculina)	4h	24 h	4h	24 h
			Incoloro Amarillo pálido	Incoloro Amarillo pálido Gris claro	Negro Gris	Negro
PYRA	Ácido piroglutámico β-naftilamida	Pirolidonil Arilamidasa	ZYM A + ZYM B / 10 min (PYRA bis LAP) (1) decolorar en caso necesario mediante luz intensa			
			Incoloro o Naranja muy pálido		Naranja	
αGAL	6-bromo-2-naftil-αD-galactopiranosida	α-Galactosidasa	Incoloro		Violeta	
βGUR	Ácido naftol-ASBI-glucoróinico	β-Giucoronidasa	Incoloro		Azul	
βGAL	2-naftil-βD-galactopiranosida	β-Galactosidasa	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
PAL	2-naftil fosfato	Fosfatasa Alcanila	Incoloro o Violeta muy pálido		Violeta	
LAP	L-leucina-β-naftilamida	Leucina Aminopeptidasa	Incoloro		Naranja	
ADH	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	Amarillo		Rojo	
			4h	24 h	4 h	24 h
<u>RIB</u>	D-ribosa	Acidificación (Ribosa)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>ARA</u>	L-arabinosa	Acidificación (Arabinosa)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>MAN</u>	D-manitol	Acidificación (Manitol)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>SOR</u>	D-sorbitol	Acidificación (Sorbitol)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>LAC</u>	D-lactosa (origen bovino)	Acidificación (Lactosa)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>TRE</u>	D-trehalosa	Acidificación (Trehalosa)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>INU</u>	Inulina	Acidificación (Inulina)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>RAF</u>	D-rafinosa	Acidificación (Rafinosa)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>AMD</u>	Almidón (2)	Acidificación (Almidón)	Rojo	Naranja / Rojo	Naranja / Amarillo	Amarillo
<u>GLYC</u>	Glicógeno	Acidificación (Glicógeno)	Rojo o Naranja		Amarillo franco	

- (1) Durante una segunda lectura después de 25 horas de incubación, se puede observar un depósito en los tubos a los cuales se han añadido reactivos ZYM A y ZYM B. Este fenómeno es normal y no debe ser tomado en consideración.
- (2) La acidificación del almidón es con frecuencia menos intensa que la de otros azúcares.
- (3) Una coloración rosa pálido obtenida después de 10 minutos debe ser considerada negativa.