



H. Veracruz, Ver, 09/julio/2018

OFICIO ITV/DEPI/324/2018
Asunto: Asignación de Co-Dirección de Tesis

DR. OSCAR GONZÁLEZ RÍOS
PROFESOR DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA
PRESENTE

Conociendo su trayectoria docente y de investigación, me permito por este conducto asignarle la comisión de co-dirigir la tesis "Aislamiento, caracterización bioquímica y molecular de Bacterias Ácido-Lácticas (BAL) potencialmente productoras de compuestos antifúngicos a partir de la microbiota del cacao". El estudiante Cervantes Ilizaliturri Angel Arturo, es quién ha sido designado bajo su co-tutela para desarrollar el tema de tesis.

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica®
Antorcha y Luz de Fuego Permanente®

DR. BENIGNO ORTIZ MUÑOZ
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INVESTI



c.c.p. Expediente

BOM

SECRETARIA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION





CONSTANCIA DE REALIZACIÓN DEL ACTO DE EXAMEN DE GRADO DE MAESTRIA

El suscrito Director del Instituto Tecnológico de Veracruz, hace constar que en el Libro para Actas de Examen de Grado de Maestría N° 1 autorizado el día 18 del mes de Agosto del 2014 por la Dirección de Servicios Escolares y Estudiantiles de la Dirección General del Tecnológico Nacional de México, se encuentra asentada en la foja número 140 el Acta que a la letra dice: En la H. Veracruz, Veracruz a los 26 días del mes de junio de 2020, siendo las 13:00 horas, se reunieron en el Aula Magna del Instituto Tecnológico de Veracruz, clave 30DIT0002U, el jurado integrado por:

Presidente(a): Doctora en Ciencias de los Alimentos Mirna Leonor Suárez Quiroz 5691003

Secretario(a): Doctora en Ciencias en Alimentos Patricia Guillermina Mendoza García 7768863

Vocal: Doctor en Ciencia de Alimentos Hugo Sergio García Galindo 3509139

Y de acuerdo con las disposiciones reglamentarias en vigor, se procedió a efectuar el examen de Grado de Maestría a el (la) C. ANGEL ARTURO CERVANTES ILIZALITURRI, número de control M18020005 aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA.

Tomando en cuenta el contenido de la TESIS cuyo título es: "Aislamiento y caracterización de bacterias ácido-lácticas aisladas del cacao con capacidad antifúngica" que fue dirigida por Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz; Dra. Claudia Yuritzí Figueroa Hernández; Dr. Oscar González Ríos, una vez concluido el examen oral, dictaminó que fuera APROBADO (A).

El (la) Presidente (a) del jurado le hizo saber a el (la) sustentante el resultado obtenido, el Código de Ética Profesional y le tomó la Protesta de Ley. Dándose por terminado el Acto a las 14:22 horas, y una vez escrita, leída y aprobada, fue firmada para constancia por las personas que en el acto intervinieron, para los efectos legales a que haya lugar se asienta la presente.

Rubrican.

Se extiende esta certificación a los siete días del mes de octubre de dos mil veinte.

COTEJÓ

Carlos Julián Genis Triana
Jefe del Departamento
de Servicios Escolares



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE VERACRUZ
DIRECCIÓN

MARCO ANTONIO SALGADO CERVANTES
DIRECTOR



EDUCACIÓN
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO®



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

**“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-
LÁCTICAS AISLADAS DEL CACAO CON CAPACIDAD
ANTIFÚNGICA”**

TESIS

Que para obtener el grado de:

Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica

Presenta

Angel Arturo Cervantes Ilizaliturri

Directores:

Mirna Leonor Suárez Quiroz

Claudia Yuritzi Figueroa Hernández

Oscar González Ríos

H. VERACRUZ, VER.

Junio -2020



EDUCACIÓN

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Instituto Tecnológico de Veracruz

Subdirección Académica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

H. Veracruz, Ver., 10/Junio/2020

OFICIO No. ITV/DEPI/214/2020

Asunto: Autorización de impresión

**C. ÁNGEL ARTURO CERVANTES ILIZALITURRI
PRESENTE**

Por este conducto se le comunica que su tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica titulada:

**"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido-lácticas
aisladas del cacao con capacidad antifúngica"**

Fue aprobada en su totalidad en cuanto a formato y calidad del contenido a satisfacción del H. Jurado del examen, por lo que está Usted autorizado a editar la presentación definitiva del trabajo.

ATENTAMENTE

«Excelencia en Educación Tecnológica»
«Antorcha y Luz de Fuego Permanente»

**BENIGNO ORTIZ MUÑOZ
JEFE DE LA DIV. EST. POSG. E INVEST**

**MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ
PRESIDENTE**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE VERACRUZ
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA
SECRETARIO**

**HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO
VOCAL**

**ÓSCAR GONZÁLEZ RÍOS
SUPLENTE 1**

**CLAUDIA Y. FIGUEROA HERNÁNDEZ
SUPLENTE 2**



Calz. Miguel Ángel de Quevedo 2779, Col. Formando Hogar
C.P. 91897, Veracruz, Ver. Tel. (229) 934 1500

www.veracruz.tecnm.mx





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

El presente trabajo de tesis titulado **"Aislamiento y caracterización de bacterias ácido-lácticas aisladas del cacao con capacidad antifúngica"** presentado por el (la) C. **Ángel Arturo Cervantes Ilizaliturri**, ha sido aprobado por su comité tutorial como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA

DIRECTORA

MIRNA L. SUÁREZ QUIROZ

CO-DIRECTOR

ÓSCAR GONZÁLEZ RÍOS

CO-DIRECTORA

CLAUDIA Y. FIGUEROA HERNÁNDEZ

REVISOR

PATRICIA G. MENDOZA GARCÍA

REVISOR

HUGO SERGIO GARCÍA GALINDO



Dra. Claudia

Esta tesis se la dedico a usted, no olvidaré lo que ha hecho e hizo por mí a lo largo de este camino durante la maestría, y es que no tengo cómo agradecerle por todo, es una persona extraordinaria en lo profesional cómo en lo personal que me siento afortunado de que Dios la haya puesto en mi camino y le doy gracias por ello, a todos sus conocimientos, experiencias, consejos, a su paciencia y dedicación, a enseñarme que nunca hay que rendirse y tener siempre la motivación para salir adelante entre otras cosas, a todo eso le doy gracias doctora ya que por ello eh llegado hasta aquí.

DEDICATORIA

A mis padres

Teresa y Arturo, que sin su inmenso apoyo incondicional no hubiese podido realizar mi maestría, que a pesar de los muchos obstáculos que presenté no me dejaron solo, al contrario, siempre fueron motivación para seguir adelante, gracias por todo.

A mi hermana

Karla, que siempre está ahí para mí no importa lo que se acontezca jamás me deja solo, es mi segunda mamá.

A Mildreth

Mi lucecita que vino a encender mi vida y mi camino cuando más lo necesitaba, a enseñarme que no todo está dicho y que la esencia que nos hace ser como personas es más valiosa que otra cosa y es la que habla por nosotros, le agradezco la comprensión y dedicación de su tiempo, por entenderme siempre y por su cariño e inmenso amor que me llena de alegría el corazón, por eso y muchas otras cosas más, te amo chaparrita.

AGRADECIMIENTOS

A **Jehová**, el único que con su voluntad pudo hacer posible que llegara a mis metas y objetivos, jamás estuve sólo, gracias padre.

A mi asesora y directora de este proyecto, la **Dra., Mirna Leonor Suárez Quiroz** que me brindo la mano y la oportunidad de pertenecer a su excelente grupo de trabajo, por brindarme sus conocimientos y apoyo en todo momento.

A mi asesora, la **Dra. Claudia Yuritzi Figueroa Hernández** por confiar en mí y que estuvo siempre al pie del cañón, por ser para mí como una madre académica a la cual le estoy inmensamente agradecido por brindarme sus conocimientos y aportaciones invaluable.

Al **Dr. Oscar Gonzáles Ríos** por siempre llevarte al punto en donde te das cuenta que eres capaz de muchas cosas y no limitarte, el siempre saca lo mejor de las personas y sus aportaciones siempre ayudan a tener un mejor panorama de las cosas, gracias doctor.

A mi comité revisor, **Dr. Hugo Sergio García Galindo** y **Dra. Patricia Guillermina Mendoza García**, gracias por su tiempo invertido en la revisión de este trabajo que se enriqueció de sus conocimientos y aportaciones.

A **Óscar Aurelio Martínez Romero** que lo considero cómo un hermano, mi hermano de la maestría, pocas son las personas que te brindan la mano sin conocerte completamente y sin esperar nada a cambio, una de ellas es Óscar, gracias camarada por hacer más ameno mi transición por esta hazaña llamada maestría, por esas largas pláticas y consejos, gracias.

A **Óscar Osiel Romero Chapol** “el carnalito” que mutuamente fuimos un apoyo para poder concretar algunos de nuestros objetivos que con esfuerzo siempre lográbamos llevarlos a cabo.

A **Eli** y **Monse** que fueron de gran apoyo también en este camino de la investigación.

A mis compañeros del laboratorio de Nanotecnología que me abrieron sus puertas y me hicieron sentir parte de ellos, jamás olvidare sus ocurrencias y tanta alegría que emanaban, no hubieran sido igual los últimos meses de la maestría sin ustedes gracias por todo.

A mis compañeros de grupo de trabajo, el laboratorio de Bromatología y el laboratorio de café, sin duda sus aportaciones, su ayuda y conocimiento hicieron también posible la realización de este trabajo que con esfuerzo se llevó a cabo, gracias.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

RESUMEN

Angel Arturo Cervantes Ilizaliturri. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Diciembre 2019. **AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AISLADAS DEL CACAO CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA.** Directores: **Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dra. Claudia Yuritzi Figueroa Hernández y Dr. Oscar González Ríos**

En la cadena productiva del cacao puede existir contaminación por hongos, la cual tiene una mayor incidencia en las etapas de secado y almacenamiento, esto afecta la calidad e inocuidad del cacao. Por otro lado, se sabe que la presencia de algunas bacterias ácido-lácticas (BAL) pueden inhibir el crecimiento de algunos hongos. Por tal motivo, el objetivo de este estudio fue aislar, caracterizar bioquímicamente y evaluar la capacidad de producción de compuestos antifúngicos por las bacterias ácido-lácticas aisladas durante la fermentación del grano de cacao. La caracterización morfológica y bioquímica de BAL autóctonas del cacao se llevo a cabo mediante tinción de Gram, pruebas de catalasa, oxidasa, producción de CO₂, pruebas de crecimiento a diferentes condiciones de temperatura, sal y pH, así como pruebas de fermentación y/o asimilación de carbohidratos con el uso del sistema API-50CHL. Para evaluar el efecto inhibitorio de las BAL sobre el crecimiento de los hongos toxigénicos del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ochraceus* y *A. carbonarius*) se realizaron pruebas de confrontación utilizando el cultivo bacteriano y el extracto libre de células de cada una de las cepas de BAL estudiadas. La naturaleza química de los compuestos con actividad antifúngica en los extractos libres de células se determinó mediante la eliminación sucesiva del efecto de los ácidos, del peróxido de hidrógeno y de la producción de compuestos de origen proteico. La cuantificación de ácidos orgánicos con capacidad antifúngica (láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico) fueron se realizó por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC). Finalmente, se realizó una prueba para evaluar el potencial *in vivo* de las cepas de BAL. Como resultados se aislaron e identificaron bioquímicamente cuatro cepas de *Lactobacillus plantarum*; una de *Lactobacillus fermentum*; dos de *Lactobacillus brevis* y una de *Leuconostoc mesenteroides ssp. cremoris* del proceso de

fermentación del grano de cacao. Las pruebas de confrontación de los cultivos y de los extractos libres de células de las BAL mostraron tener un efecto inhibitorio. *A. ochraceus* mostró una mayor susceptibilidad a los extractos libres de células de las BAL, con un efecto inhibitorio cercano al 90%. Las cepas que mostraron tener un mayor efecto antifúngico fueron *Lb. plantarum*, y *Lb. fermentum*. El efecto antifúngico de las cepas de *Lb. plantarum* contra las tres especies de *Aspergillus*, se debió principalmente a su capacidad productora de ácidos orgánicos como láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico mientras que en el caso de *Lb. fermentum* su efecto antifúngico se debe posiblemente a la producción de compuestos de otra naturaleza como pueden ser compuestos orgánicos volátiles o ácidos grasos hidroxilados. Finalmente se evaluó el potencial antifúngico de las cepas de *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum* en una prueba de confrontación *in vivo* sobre el crecimiento de los hongos en la superficie de los granos de cacao fermentado, encontrándose que la cepa de *Lb. plantarum* 2 (BAL 4) fue la que mostró un mayor potencial antifúngico sobre el crecimiento de los hongos evaluados. Por esta razón, se concluye que la cepa *Lb. plantarum* 2 (BAL 4) tiene potencial para ser utilizada como biocontrol en la cadena productiva del cacao.

ABSTRACT

Angel Arturo Cervantes Ilizaliturri. Maestría en Ciencias de Ingeniería Bioquímica. Unidad de Investigación y Desarrollo de Alimentos del Instituto Tecnológico de Veracruz. Diciembre 2019. **“AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS AISLADAS DEL CACAO CON CAPACIDAD ANTIFÚNGICA”.** Advisors: Dra. Mirna Leonor Suárez Quiroz, Dra. Claudia Yuritzi Figueroa Hernández and Dr. Oscar González Ríos

The cocoa processing chain is susceptible to fungal contamination, which has a significant impact on the drying and storage, affecting the quality and safety of the cocoa. On the other hand, it is known that the presence of some lactic acid bacteria (LAB) can inhibit the growth of some fungi. For this reason, the aim of this study was to isolate, characterize biochemically and evaluate the capacity of production of antifungal compounds by the lactic acid bacteria isolated during the fermentation of the cocoa bean. Morphological and biochemical characterization of cocoa autochthonous LAB was conducted by Gram staining, catalase and oxidase tests, CO₂ production, growth tests at different temperatures, salts and pH levels, and also fermentation and/or carbohydrate assimilation tests using the API-50CHL system. To evaluate the inhibitory effect of lactic acid bacteria against toxigenic fungi of the genus *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. ochraceus* and *A. carbonarius*) growth, confrontation tests using the bacterial culture and the cell-free extract of each of the LAB strains studied. The nature of the chemical compounds with antifungal activity in the cell-free extracts was determined by the sequential removal of the effects of acids, hydrogen peroxide and the proteinaceous compounds production. Quantification of organic acids with antifungal capacity (lactic, acetic, succinic and 3-phenyl-lactic) was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). Finally, a test was carried out to evaluate the *in vivo* potential of LAB strains. As a result, four strains of *Lactobacillus plantarum*; one strain of *Lactobacillus fermentum*; two strains of *Lactobacillus brevis* and one strain of *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* were isolated and biochemically identified from the cocoa bean fermentation process. The confrontation tests of cultures and cell-free extracts of LAB against the

growth of three fungal species of the genus *Aspergillus* showed an inhibitory effect. *A. ochraceus* was found to have a higher susceptibility to cell-free LAB extracts, with an inhibitory effect of about 90%. The strains that showed a greater antifungal effect were *Lb. plantarum*, and *Lb. fermentum*. The antifungal effect of *Lb. plantarum* strains isolated from cocoa against the three fungi of the genus *Aspergillus*, was mainly attributed to its capacity to produce organic acids such as lactic, acetic, succinic and 3-phenyl-lactic acids while in the case of *Lb. fermentum* its antifungal effect is due to the production of compounds of other nature such as volatile organic compounds or hydroxylated fatty acids. Finally, the antifungal potential of *Lb. plantarum* and *Lb. fermentum* strains was evaluated on an *in vivo* confrontation test on the growth of fungi on the surface of fermented cocoa beans, and it was found that the *Lb. plantarum* 2 strain (BAL 4) showed the highest antifungal potential on the growth of the evaluated fungi. For this reason, it is concluded that *Lb. plantarum* 2 (BAL 4) has the potential to be used as a biocontrol in the cocoa production chain.

CONTENIDO

RESUMEN.....	viii
ABSTRACT	x
INDICE DE TABLAS	xvi
INDICE DE FIGURAS.....	xvii
INTRODUCCION.....	1
1. ANTECEDENTES.....	3
1.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	3
1.1.1 Aspectos generales de las BAL.....	3
1.1.2. Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas	4
1.1.2.1 Metabolismo de azúcares.....	4
1.1.2.1.1 BAL homofermentativas (vía EMP)	5
1.1.2.1.2. BAL heterofermentativas (vía del 6-fosfogluconato o de las pentosas fosfato)	7
1.1.2.1.3. BAL heterofermentativas facultativas.....	8
1.1.2.2 Metabolismo de ácidos orgánicos.....	9
1.1.2.3. Metabolismo de proteínas y compuestos nitrogenados	10
1.1.3. Clasificación de las BAL	11
1.1.3.2. <i>Lactococcus</i>	12
1.1.3.3. <i>Leuconostoc</i>	12
1.1.3.4. <i>Pediococcus</i>	13
1.1.4. Identificación de bacterias ácido-lácticas.....	14
1.1.4.1 Identificación fenotípica clásica	14
1.1.4.2 Identificación genotípica o molecular	14
1.1.5 Hábitats de las bacterias ácido-lácticas.....	16
1.1.6 Importancia de las BAL en la industria alimentaria.....	16
1.1.6.1 Papel de las BAL en los alimentos fermentados	17
1.1.6.2. Propiedades antagónicas de las bacterias ácido lácticas	19

1.1.6.3. Actividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas	20
1.1.6.4. Principales compuestos con actividad antifúngica producidos por las BAL	23
1.1.6.4.1 Principales características y mecanismo de acción de los compuestos con potencial antifúngico	26
1.1.6.4.2 Ácidos orgánicos	27
1.1.6.4.3. Ácido 3- fenil-láctico.....	28
1.1.6.4.4. Peróxido de hidrógeno.....	29
1.1.6.4.5. Compuestos proteicos.....	30
1.1.6.4.6. Otros tipos de compuestos	31
1.2.1 Fermentación del grano de cacao	31
1.2.1.1 Importancia de las BAL en la fermentación del cacao	34
1.4 Ocurrencia de hongos toxigénicos en la fermentación y en otras etapas de la cadena productiva del cacao	37
1.4.1. Producción de micotoxinas por hongos toxigénicos en granos de cacao.....	38
1.4.2. Características generales de las micotoxinas	38
1.4.3. Incidencia de hongos toxigénicos en la cadena productiva del cacao.....	42
1.5 Principales hongos toxigénicos en la fermentación y en otras etapas de la cadena productiva del cacao	42
1.6 Uso de las BAL como alternativa para biocontrol de los hongos en la cadena productiva del cacao	44
2. OBJETIVOS	45
2.1 General	45
2.2 Específicos.....	45
3. HIPÓTESIS.....	46
4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	47
5. MATERIALES Y METODOS	48
5.1. Material Biológico	48
5.1.1 Granos de cacao fermentados.....	48
5.1.2 Cepas productora de Ocratoxina A	49
5.1.3 Cepas de Bacterias Lácticas.....	49
5.2 Metodología general	50
5.2.1 Muestreo.....	51
5.2.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) de los granos de cacao	51

5.3. Caracterización morfológica y bioquímica de las BAL aisladas de la fermentación de cacao	52
5.3.1 Tinción de Gram.....	53
5.3.2 Prueba de catalasa	53
5.3.5 Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas.....	54
5.3.6 Pruebas de crecimiento a diferentes condiciones salinas	55
5.3.7 Pruebas de producción de dióxido de carbono (CO ₂).....	55
5.3.8 Codificación y almacenamiento de las cepas de BAL	55
5.4 Pruebas de confrontación de las bacterias ácido-lácticas con los hongos toxigénicos	57
5.4.1 Preparación de inóculos de hongos para pruebas de confrontación	57
5.4.2 Preparación de inóculos de BAL para las pruebas de confrontación.....	58
5.4.3 Pruebas de confrontación de los cultivos celulares de BAL o extractos libres de células sobre la germinación de hongos toxigénicos	59
5.4.4 Determinación de la actividad antifúngica de los extractos libres de células..	60
5.5 Determinación de la naturaleza química de los extractos libres de células	62
5.6 Cuantificación de los principales compuestos con actividad antifúngica presentes en los extractos libres de células de la BAL con mayor potencial.....	63
5.7 Prueba de validación <i>in vivo</i> del efecto antifúngico utilizando granos de cacao	65
6. RESULTADOS Y DISCUSION	67
6.1 Seguimiento de temperatura y pH durante la fermentación en caja estática de los granos de cacao	67
6.2 Aislamiento de BAL de la fermentación de cacao	69
6.3 Caracterización morfológica y bioquímica de las BAL aisladas de la fermentación de cacao	69
6.3.1 Caracterización morfológica macroscópica	69
6.3.2 Caracterización morfológica microscópica de las bacterias aisladas de la fermentación del cacao	72
6.4 Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de la fermentación del cacao	74
6.4.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa	74

6.4.2 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones de temperatura	75
6.4.3 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones de pH	76
6.4.4 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones salinas	77
6.4.5 Pruebas de la capacidad de producción de dióxido de carbono (CO ₂) de las BAL aisladas de la fermentación del cacao	78
6.5 Pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos de las BAL aisladas de la fermentación del cacao	79
6.6 Pruebas de actividad antifúngica de los cultivos celulares de las BAL y los extractos libres de células sobre la germinación de esporas	85
6.6.1 Prueba de actividad antifúngica de los cultivos celulares de las BAL sobre la germinación de esporas de <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>A. ochraceus</i>	85
6.6.2 Prueba de actividad antifúngica de los extractos libres de células de BAL sobre la germinación de esporas de <i>A. flavus</i> , <i>A. carbonarius</i> y <i>A. ochraceus</i>	89
6.9. Determinación de la actividad antifúngica del extracto libre de células.....	91
6.12. Cuantificación de los principales compuestos con actividad antifúngica	96
6.13. Validación <i>in vivo</i> del efecto antifúngico empleando granos de cacao.....	100
7. CONCLUSIONES.....	103
8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS	104
9. BIBLIOGRAFÍA.....	105
10. APÉNDICES.....	123

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1 Principales compuestos con actividad antifúngica	24
Tabla 1.2 Micotoxinas en los alimentos	39
Tabla 6.1. Características morfológicas de las colonias aisladas	70
Tabla 6.2. Morfología microscópica de las colonias aisladas	73
Tabla 6.3. Resultados pruebas de catalasa y oxidasa de BAL aisladas	75
Tabla 6.4. Crecimiento de las cepas bacterianas a diferentes temperaturas	76
Tabla 6.5. Crecimiento a diferentes concentraciones salinas	78
Tabla 6.6. Capacidad de producción de dióxido de carbono por las cepas	79
Tabla 6.7. Perfil de asimilación de carbohidratos	81
Tabla 6.8. Prueba de germinación de hongos toxigénicos por BAL	86
Tabla 6.9. Prueba de germinación de hongos toxigénicos extractos libres de BAL.....	91
Tabla 6.10. Efecto de la producción de ácidos orgánicos en la actividad antifúngica de los extractos libres de células de las BAL	95
Tabla 6.11. Cuantificación de ácidos orgánicos y valor de pH en los extractos libres de células de las BAL	97
Tabla 6.12. Comparación de las concentraciones obtenidas de ácido láctico, acético y 3-fenil-láctico con otros estudios	99
Tabla 6.13 Efecto in vivo del efecto antifúngico de las BAL en los granos de cacao fermentados	102

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Vía homofermentativa de la glucosa por las bacterias ácido-lácticas	6
Figura 1.2. Vía heterofermentativa de la glucosa por las bacterias ácido-lácticas...	8
Figura 1.3. Metabolismo del citrato por las bacterias ácido-lácticas	9
Figura 1.4. Principales funciones de las BAL en la producción de alimentos fermentados	19
Figura 1.5. Relación existente entre el alimento-hongo-agente antifúngico	20
Figura 1.6. Principales características de los compuestos antifúngicos producidos por las BAL	27
Figura 1.7. Principales fases de la fermentación del grano de cacao	33
Figura 1.8. Estructura química de la ocratoxina A	41
Figura 5.1. Mazorcas de cacao.....	48
Figura 5.2. Cajas de fermentación	48
Figura 5.3. Cepas de Hongos (<i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> y <i>Aspergillus ochraceus</i>)	49
Figura 5.4. Esquema general de la metodología del proyecto	50
Figura 5.5. Toma de muestra de grano de cacao fermentado de las cajas de Fermentación estáticas	51
Figura 5.6. Cepas aisladas de la fermentación del grano de caja en agar MRS	53
Figura 5.7. Esquema general de la etapa de caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias ácido-lácticas	56
Figura 5.8. Galerías API 50CHL de BioMerieux	57
Figura 5.9. Metodología empleada para la preparación de inóculos de hongos ...	58
Figura 5.10. Metodología para las pruebas de actividad antifúngica de las cepas de BAL aisladas del cacao	60
Figura 5.11. Diseño de la prueba para la determinación de la actividad Antifúngica del extracto libre de células	62
Figura 5.12. Validación in vivo de la producción de compuestos	

antifúngicos empleando como base un medio con pulpa de cacao	66
Figura 6.1 Monitoreo de temperaturas durante la fermentación del cacao	67
Figura 6.2. Pruebas de confrontación de las BAL con las cepas de hongo toxigénicas.....	87
Figura 6.3. Actividad antifúngica (%) de los extractos libres de células de Las BAL.....	93

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Símbolo	Definición
μm	Micrómetro
°C	Grados Celsius
μg	Microgramo
Abs	Absorbancia
ADN	Acido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BA	Bacteria acética
BAL	Bacteria acido-láctica
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CL	citrato-liasa
CO ₂	Dióxido de carbono
CoA	Acetil coenzima A
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización
EMP	vía Embden-Meyerhof-Parnas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
g	Gramo
G	Medida de aceleración (incremento de velocidad causa de la gravedad)
G3F	Gliceraldehído- 3-fosfato
GRAS	Generalmente reconocidos como seguros
h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HCl	Ácido clorhídrico
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Kg	Kilogramo
<i>Lb.</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Leuc.</i>	<i>Leuconostoc</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MRS	Medio de cultivo Mann Rogosa Sharpe
NaCl	Cloruro de sodio
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
OAD	Descarboxilasa
OMS	Organización mundial de la salud
OTA	Ocratoxina A
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Concentración de iones hidrógeno o Potencial de hidrogeno
pKa	Constante de disociación ácida
PLA	Ácido fenil-láctico

t | Temperatura
UFC | Unidades Formadoras de Colonias

INTRODUCCION

Los granos de cacao (*Theobroma cacao*) son la materia prima principal para la producción de chocolate. La fermentación de los granos es esencial para eliminar la pulpa que envuelve los granos y desarrollar precursores característicos del chocolate (Fowler, 2009; Thompson *et al.*, 2013). Los azúcares y polisacáridos presentes en la pulpa de cacao son fermentados por microorganismos, produciendo metabolitos y condiciones que producen la muerte del grano, iniciando una serie de reacciones bioquímicas. Estas transformaciones bioquímicas que suceden en el interior del grano son las responsables de la generación de los precursores del sabor y aroma del chocolate. Posteriormente, durante el tostado y secado estos precursores sufren transformaciones que permiten que se desarrolle el sabor y aroma característico del chocolate (Schwan y Wheals, 2004, Afoakwa *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011; Schwan *et al.*, 2015). Aunque la fabricación de chocolate es una industria multimillonaria, cuyo valor global se calcula en más de \$100 billones de dólares en 2019 (Abesamis, 2019), la fermentación de grano de cacao sigue siendo un proceso tradicional no controlado (Pereira *et al.*, 2013), el cual es conducido por una sucesión de microorganismos autóctonos, principalmente levaduras, bacterias ácido-lácticas y bacterias ácido acéticas (Schwan y Wheals, 2004; Lima *et al.*, 2011).

Una de las problemáticas más importantes de la cadena productiva del cacao es la infección por hongos filamentosos, ya sea cuando se encuentra en campo o durante su almacenamiento. Algunos de estos hongos producen metabolitos secundarios tóxicos como las micotoxinas, las cuales pueden ser potentes carcinógenos en humanos. Por esta razón, se requiere prevenir y controlar el crecimiento de hongos durante toda la cadena productiva del cacao. En los últimos años, se ha demostrado que las bacterias ácido-lácticas (BAL) poseen actividades antagonistas contra el crecimiento de hongos y bacterias patógenas. Estas propiedades están asociadas con una gran variedad de compuestos producidos

durante el proceso de fermentación. Recientemente se han reportado estudiado los compuestos antifúngicos producidos por las BAL debido a que pueden ser una alternativa para lograr la disminución de esta problemática. Algunos de los compuestos producidos por las BAL que han mostrado tener efectos antibacterianos y/o antifúngicos son: ácido láctico, ácido acético, ácido benzoico, dióxido de carbono, peróxido de hidrógeno, diacetilo, ácido 3-fenil-láctico, bacteriocinas, ácidos grasos y dipéptidos cíclicos. Lo anterior, pone de manifiesto la potencialidad de las bacterias ácido- lácticas autóctonas del proceso de fermentación de cacao como agentes biológicos o biocontrol para inhibir el crecimiento de hongos durante el almacenamiento del cacao.

1. ANTECEDENTES

1.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL)

El término de bacteria ácido-láctica (BAL) fue acuñado a principios del siglo XIX para definir a un grupo heterogéneo de bacterias con la característica común de producción de ácido láctico como producto principal. En el año de 1873, Joseph Lister logró aislar la primera bacteria ácido-láctica, la cual fue nombrada *Bacterium lactis*, hoy nombrada como *Lactococcus lactis* (Aryana y Olson, 2017).

1.1.1 Aspectos generales de las BAL

Las bacterias ácido-lácticas son un grupo heterogéneo de microorganismos que pertenecen al *phylum* Firmicutes, los cuales comparten ciertas características morfológicas, fisiológicas y metabólicas. Son microorganismos Gram positivos, no formadores de esporas, inmóviles, anaerobios, catalasa negativos, oxidasa negativos, anaerobios o anaerobios facultativos, en forma de cocos o bacilos y que producen ácido láctico como producto final principal durante la fermentación de carbohidratos. Sin embargo, se ha reportado que estas características a excepción de la incapacidad de formar esporas y el carácter Gram positivo, pueden variar en función a la cepa, especie o las condiciones de cultivo, lo cual complica su correcta identificación (Khalid, 2011; König y Fröhlich, 2017). Además, las BAL son tolerantes en ambientes con bajo pH, logrando crecer hasta en condiciones con valores de pH de 3.2. Sin embargo, la gran mayoría de las BAL crecen en ambientes con un valor de pH entre 4 y 4.5, lo cual les permite sobrevivir en medios en donde la mayoría de los microorganismos no pueden crecer (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011)

Desde el punto de vista fisiológico, las BAL son microorganismos quimiótrofos, es decir, obtienen sus requerimientos energéticos de la oxidación de

compuestos químicos, como los carbohidratos, principalmente hexosas. La oxidación de los carbohidratos es la principal ruta metabólica de este tipo de bacterias (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Las BAL pueden ser clasificadas de acuerdo con su metabolismo como: homofermentativas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas.

Las BAL comprenden alrededor de 30 géneros, que están incluidos en el filo Firmicutes, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza debido a su gran capacidad de adaptación a diversos ambientes. En la actualidad, se considera, que las BAL están distribuidas de forma ubicua en la corteza terrestre, en el tracto intestinal de peces, crustáceos, mamíferos y humanos; así como en una gran cantidad de vegetales, frutas y otros productos alimenticios (Endo y Dicks, 2011). Debido a que se han podido aislar de una gran cantidad de fuentes, las BAL se han utilizado para la producción de una gran cantidad de alimentos y bebidas fermentadas, ya que producen una gran cantidad de compuestos que contribuyen al sabor, aroma y textura de estos. Además, de estas propiedades, también producen compuestos que pueden aumentar el valor nutricional de los alimentos.

1.1.2. Metabolismo de las bacterias ácido-lácticas

Como se mencionó anteriormente, las BAL son organismos quimiótrofos, es decir obtienen su energía a partir de la oxidación de compuestos químicos, principalmente azúcares (hexosas). La oxidación de estos azúcares constituye la ruta principal de producción energética en las bacterias ácido-lácticas (Ribereau-Gayon *et al.*, 2006). Sin embargo, las BAL son microorganismos nutricionalmente exigentes y requieren de la adición de sales minerales, vitaminas y aminoácidos en los medios de crecimiento. Cuando son crecidos en medio sintético, presentan una escasa tasa de crecimiento. Las exigencias nutricionales dependerán de la cepa de BAL utilizada (Endo y Dick, 2014).

1.1.2.1 Metabolismo de azúcares

La característica principal que define a las BAL es la propiedad de producir ácido láctico a partir del proceso de fermentación de carbohidratos. Desde un punto

de vista bioquímico, la fermentación es el proceso catabólico anaeróbico en el cual los carbohidratos y compuestos afines son oxidados con la liberación de energía en ausencia de aceptores externos de electrones. Los compuestos orgánicos producidos del desdoblamiento de carbohidratos son los aceptores finales. Durante la fermentación se produce la oxidación incompleta del compuesto inicial liberando solamente una pequeña cantidad de energía (Jay, 2002).

Las BAL poseen dos rutas metabólicas para fermentar los carbohidratos, principalmente hexosas; estas son la fermentación homoláctica (glucólisis o vía Embden-Meyerhof-Parnas) y la fermentación heteroláctica (vía del 6-fosfogluconato o vía de las pentosas). Basándose, en estas vías fermentativas, las BAL pueden clasificarse como: homofermentativas, heterofermentativas obligadas y heterofermentativas facultativas. Las BAL homofermentativas poseen las enzimas aldosa y hexoisomerasa, pero carecen de fosfoacetolasa; por lo tanto, sólo pueden fermentar carbohidratos por la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Por otro lado, las heterofermentativas poseen fosfoacetolasa, pero carecen de aldosa y hexoisomerasa, por lo que no pueden emplear la vía EMP, y por lo tanto utilizan la vía del 6-gluconato o la vía de las pentosas. Las heterofermentativas facultativas pueden emplear la vía EMP, la vía del 6-fosfogluconato o bien la vía de las pentosas para fermentar los carbohidratos (Mozzi, 2015). Como se observa, las rutas de asimilación de azúcares son dependientes de la cepa, por esta razón pueden ser utilizadas como criterio para la identificación de cepas de BAL.

Cabe destacar, que algunas bacterias ácido-lácticas pueden incorporar en su metabolismo de azúcares a las pentosas, las cuales entran a la célula microbiana a través de permeasas donde rápidamente son fosforiladas y convertidas en ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5 fosfato y son posteriormente incorporadas a las rutas antes mencionadas (Axelsson, 2004).

1.1.2.1.1 BAL homofermentativas (vía EMP)

En esta clasificación se encuentran las bacterias ácido-lácticas que producen más de un 85 % de ácido láctico a partir de la glucosa, incluyéndose los géneros de

Lactococcus, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus* (Jay, 2002; Mozzi, 2015).

Durante la glucólisis, bajo condiciones normales (condiciones anaeróbicas o con oxígeno limitado y con un aporte no limitado de carbohidratos), una molécula de glucosa es teóricamente fermentada a dos moléculas de ácido láctico con una ganancia neta de dos moléculas de ATP, el doble de energía de la que son capaces de obtener las BAL heterofermentativas. Los primeros pasos del proceso implican la fosforilación e isomerización de la glucosa a fructosa -1, 6 difosfato y su posterior conversión a dihidroxiacetona fosfato y gliceraldehído- 3-fosfato (G3F). Después de varias reacciones el G3F es convertido en piruvato, el cual finalmente es reducido a ácido láctico (Figura 1.1) por la acción enzimática del lactato deshidrogenasa empleando como cofactor una molécula de NADH. Posteriormente este cofactor es oxidado a NAD^+ para obtener el equilibrio redox (Holzapfel y Wood, 2014).

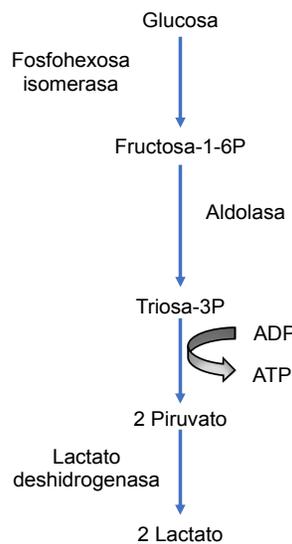


FIGURA 1.1 Vía homofermentativa de la glucosa por las bacterias ácido-lácticas.

Adaptada de Axelsson, 2004

1.1.2.1.2. BAL heterofermentativas (vía del 6-fosfogluconato o de las pentosas fosfato)

Dentro de este grupo se encuentran las BAL que producen un 50% de ácido láctico y cantidades equimolares de otros compuestos como alcoholes, dióxido de carbono (CO₂) y aldehídos, a partir de hexosas. Dentro de los géneros de BAL con metabolismo heteroláctico tenemos a *Leuconostoc*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus* (Jay, 2002; Khalid, 2011). La vía del 6- fosfogluconato comienza con la fosforilación de la glucosa a glucosa 6-fosfato (misma reacción que la vía EMP). Algunas de las reacciones claves de esta vía son: i) la deshidrogenación de la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconato, ii) descarboxilación y epimerización de 6-fosfogluconato y iii) el fraccionamiento de la xilulosa-5-fosfato a gliceraldehído-3-fosfato (G-3P) y acetil-fosfato por la acción de la fosfocetolasa (ver Figura 1.2). El G-3P posteriormente es metabolizado a ácido láctico mediante las mismas reacciones de la vía EMP. Sin un aceptor adicional de electrones disponible, reducen el acetil-fosfato a etanol vía acetil-CoA. En teoría, la ganancia neta de energía en ATP por mol de glucosa es sólo la mitad de lo obtenido mediante la vía EMP (Holzapfel y Wood, 2014).

En la vía de las pentosas, los sustratos son transportados al interior de la célula y fosforilados a xilulosa-5- fosfato siguiendo después las reacciones de la vía 6-fosfogluconato sin la obtención de CO₂ y etanol. Mediante reacciones no oxidativas, esta vía cataliza también la interconversión de carbohidratos con tres, cuatro, cinco y siete carbonos (Holzapfel y Wood, 2014). Solo, pocas especies de BAL pueden utilizar pentitoles como el xilitol, ribitol y D-arabitol; los cuales son introducidos a la célula para posteriormente ser convertidos a sus respectivos pentitoles-5-fosfato, y son nuevamente oxidados para entrar a la vía de 6-fosfogluconato (Holzapfel y Wood, 2014).

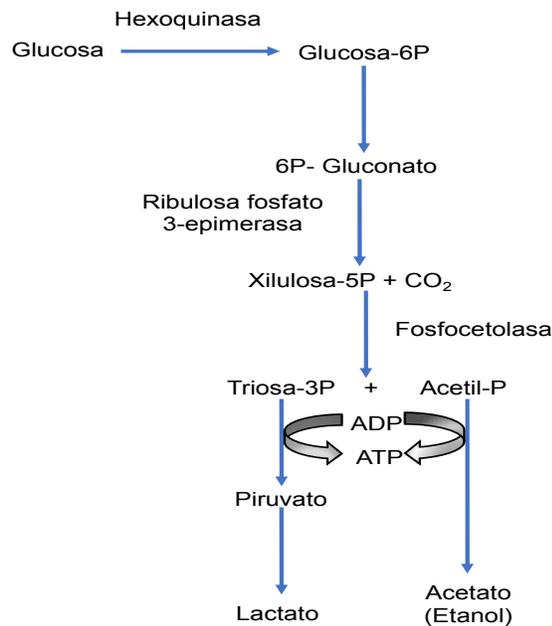


FIGURA 1.2. Vía heterofermentativa de la glucosa por las bacterias ácido-lácticas
Adaptada de Axelsson, 2004

1.1.2.1.3. BAL heterofermentativas facultativas

Son bacterias ácido-lácticas capaces de utilizar tanto la vía EMP o la 6-gluconato para dar como producto único o mayoritario ácido láctico; también pueden utilizar la vía de las pentosas empleando la fosfocetolasa inducida que les permite transformar las pentosas en ácido láctico, etanol y ácido acético. El género de BAL que agrupa más especies con este metabolismo es *Lactobacillus* (12 especies) seguido de *Pediococcus* con 5 especies (Stiles y Holzapfel, 1997).

Las BAL pueden producir ácido láctico D (-) y L (+). La proporción de producción de estos isómeros es casi idéntica en todas las cepas de la misma especie y es uno de los factores a considerarse para clasificar a las LAB. Se ha visto que en presencia de acetato se favorece la producción del isómero L (+) del ácido láctico mientras que en ausencia de acetato se producen cantidades equimolares de los isómeros (Holzapfel y Wood, 2014).

1.1.2.2 Metabolismo de ácidos orgánicos

Las bacterias ácido-lácticas también presentan la capacidad de metabolizar algunos ácidos orgánicos como el ácido cítrico, málico y tartárico, los cuales pueden encontrarse en ciertas frutas como el cacao y la uva, así como otros productos. El ácido cítrico es un intermediario en la ruta de síntesis de diacetilo, acetona o ácido acético, compuestos de gran importancia organoléptica en una gran cantidad de productos lácteos (Endo y Dicks, 2014). El metabolismo del citrato en las bacterias ácido-lácticas requiere de la participación de un transportador específico de membrana y de la actividad de la citrato-liasa (CL) y la descarboxilasa (OAD), como se observa en la Figura 1.3. Los productos finales del metabolismo del citrato dependerán del microorganismo y de las condiciones de fermentación utilizadas (García-Quintans, *et al.*, 2008).

Algunas cepas de *Leuconostoc* y *Weissella* así como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovariedad *diacetylactis*, son utilizados para la producción de diacetilo en productos lácteos. Además, de que se ha observado que *Lactobacillus plantarum* y *Oenococcus oeni* pueden utilizar el citrato presente en los medios de cultivo y realizar una fermentación secundaria en los vinos, cerveza y salchichas (García-Quintans *et al.*, 2008).

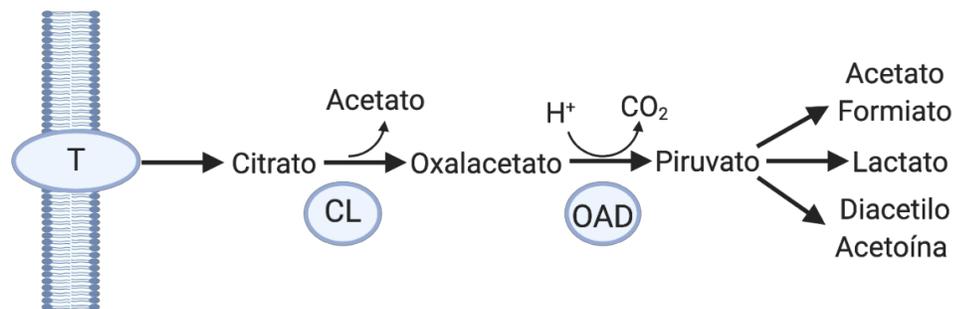


FIGURA 1.3. Metabolismo del citrato por las bacterias ácido-lácticas

1.1.2.3. Metabolismo de proteínas y compuestos nitrogenados

Las BAL exhiben una capacidad muy limitada para metabolizar el nitrógeno inorgánico. Por esta razón requieren que se le adicionen aminoácidos y vitaminas al medio de crecimiento, siendo la mayoría de las especies de BAL auxótrofas para al menos un aminoácido. Se ha demostrado que *Lactobacillus plantarum*, tiene las enzimas necesarias para la síntesis de todos los aminoácidos con excepción de leucina, isoleucina y valina; por el contrario, *Lb. johnsonii* no cuenta con las enzimas necesarias para la síntesis de la mayoría de ellos, por lo tanto, deben de adicionársele una gran cantidad de aminoácidos (Mayo *et al.*, 2010). Esto pone de manifiesto que los requerimientos dependen de la cepa de BAL empleada (Endo y Dicks, 2014). Algunas cepas cuentan con un sistema funcional que les permite hidrolizar las proteínas, principalmente la caseína, proteína principal de la leche. Este sistema conocido como sistema proteolítico les permite asimilar la caseína (y en menor proporción otras proteínas) y por lo tanto crecer en leche y otros alimentos. Los sistemas proteolíticos de las BAL constan de tres componentes principales: 1) las proteinasas ligadas a la pared celular (Prt), diversos sistemas de transporte de oligopéptidos y aminoácidos para transportar los péptidos al interior de la célula, y una gran cantidad de peptidasas intracelulares, las cuales convierten los péptidos en aminoácidos libres (Savijoki *et al.*, 2006; Mayo *et al.*, 2010). La proteólisis es de gran importancia en la industria, principalmente en la láctea, ya que la mayoría de los aminoácidos y péptidos resultantes de la hidrólisis de la caseína son empleados por la bacteria para la producción de sustancias aromáticas como alcoholes, ácidos, ésteres y compuestos sulfurados. Además, de que en las últimas dos décadas se ha demostrado que algunos de los péptidos producidos por este sistema proteolítico pueden ejercer alguna actividad biológica en los humanos. Por otro lado, las BAL también pueden producir aminas biógenas, las cuales son compuestos que pueden causar toxicidad, cuando se encuentran en grandes cantidades que se producen a través del metabolismo de aminoácidos libres (Sumbly *et al.*, 2014). Los principales productores de estos compuestos son la histidina, tirosina y ornitina produciéndose histamina, tiramina y putrescina, respectivamente. La amina biógena que causa una mayor incidencia de intoxicaciones de origen alimentario es la histamina.

1.1.3. Clasificación de las BAL

Anteriormente, las BAL estaban clasificadas en cuatro "géneros centrales" principales: *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus*, géneros relacionados en una gran cantidad de fermentaciones alimentarias (Wessels *et al.*, 2004). Esta clasificación estaba basada en estudios taxonómicos tradicionales como morfología, pruebas de fermentación de glucosa, crecimiento a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido y la tolerancia a altas concentraciones salinas y bajos pH, sin embargo, el empleo de herramientas moleculares modificó esta clasificación, por lo que actualmente las BAL están clasificadas por los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Lissococcus*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella* (Ruas-Madiedo *et al.*, 2012). A continuación, se describirán las principales características de los géneros más representativos de las bacterias ácido-lácticas.

1.1.3.1. *Lactobacillus*

Este género compuesto por 124 especies se encuentra ampliamente distribuido en vegetales, productos lácteos y cárnicos. También forman parte del tracto intestinal y vaginal de un gran número de especies. Son microorganismos que poseen estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés). Este género tiene una gran importancia industrial debido a que se utilizan para la producción de una gran cantidad de alimentos y bebidas fermentadas. Morfológicamente son bacilos Gram positivos, la gran mayoría inmóviles, aunque existen pocas especies móviles por flagelos peritricos. No son esporulados y son sacarolíticos. La característica principal de este género es la de fermentar carbohidratos produciendo ácido láctico, y puede presentar un metabolismo heterofermentativo o homofermentativo. Los lactobacilos son microorganismos anaerobios y pueden crecer en rangos de temperatura entre 2°C a 53°C, con un rango de temperatura óptima entre 30-40°C (Mattarelli *et al.*, 2014; Mozzi, 2015).

Sus requerimientos nutricionales varían según la especie, pero generalmente requieren de tiamina, piridoxina, riboflavina, biotina, ácido fólico, entre otros.

Como ya se mencionó, los lactobacilos, se encuentran en una gran variedad de ambientes ricos en carbohidratos, y se han aislado de mucosas animales y humanas, productos vegetales, lácteos y cárnicos. Se ha visto que la mayoría de las especies homofermentativas se encuentran asociadas al hombre y los animales mientras que las especies heterofermentativas se asocian a los alimentos, en donde pueden estar implicadas a un proceso de fermentación o descomposición.

Para lograr la identificación y caracterización de especies de este género se emplean diferentes técnicas tanto moleculares como fenotípicas, siendo el análisis de la composición de ADN o ARN (hibridación o secuenciación) los más confiables para su clasificación taxonómica a nivel género. Para lograr la correcta clasificación a nivel especie se utilizan técnicas moleculares basadas en PCR (Coeuret *et al.*, 2003).

1.1.3.2. *Lactococcus*

Las especies de este género tienen forma de coco, los cuales pueden estar dispuestos en pares o cadenas de longitud variable. Son bacterias Gram positivas, no esporuladas, sin flagelo, homofermentativas, que producen solo ácido láctico L (+). Son anaerobias facultativas o microaerófilas. Su temperatura óptima de crecimiento es 30°C. No crecen en concentraciones mayores a 6.5% de NaCl o cuando el pH del medio es de 9.6. Generalmente, las especies pertenecientes a este género de BAL, se encuentran en productos como la leche y cremas fermentadas, en donde desempeñan un papel determinante en la calidad sensorial y sanitaria de estos productos debido a que son los microorganismos predominantes. Las principales especies de *Lactococcus* son: *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (Gutiérrez-Méndez *et al.*, 2010).

1.1.3.3. *Leuconostoc*

Los miembros de este género de bacterias ácido-lácticas son bacterias anaerobias facultativas, catalasa negativa que se agrupan en pares y cadenas.

Dentro del género *Leuconostoc* se encuentra *Leuconostoc mesenteroides* (con sus tres subespecies *mesenteroides*, *dextranicum* y *cremoris*) y otras trece especies, como *Leuc. citreum*, *Leuc. carnosum*, *Leuc. durionis*, *Leuc. fallax*, *Leuc. ficulneum*, *Leuc. pseudoficulneum*, *Leuc. fructosum*, *Leuc. gasicomitatum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. pseudomesenteroides*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. inhae*, *Leuc. kimchi* y *Leuc. lactis* (Ogier *et al.*, 2008).

Las especies de *Leuconostoc* tienen relevancia económica debido a que son necesarias para la elaboración de diversos productos fermentados como la col agria, los pepinillos y diversos productos cárnicos. También son productores de compuestos aromáticos y dextranos en diversos productos lácteos, los cuales son compuestos con diversas aplicaciones en la industria alimentaria y farmacéutica. Sin embargo, algunas cepas de *Leuconostoc* están relacionadas en el deterioro de alimentos, principalmente productos cárnicos, pescados y caña debido a la formación de limo y como causantes de infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Hemme y Foucaud-Scheunemann, 2004).

1.1.3.4. *Pediococcus*

Las especies del género *Pediococcus* son bacterias anerobias facultativas que presentan un metabolismo homofermentativo y normalmente son cocos con 0.5-1.0 μm de diámetro, que se agrupan en pares o tétradas. Las especies que conforman a este género son nueve: *Pediococcus pentosaceus* (con sus subespecie *intemedius* y *P. stilesii*), *P. acidilactici*, *P. cellicola*, *P. claussenii*, *P. damnosus*, *P. inopinatus*, *P. parvalus*, *P. dextrinicus* (Holzapfel *et al.*, 2015).

Algunas cepas de *P. acidilactici* y *P. pentosaceus* son muy utilizadas en la industria de los alimentos para la fermentación de vegetales y productos cárnicos, debido a sus propiedades antimicrobianas, principalmente atribuidas a la pediocina (Porto *et al.*, 2017).

1.1.4. Identificación de bacterias ácido-lácticas

1.1.4.1 Identificación fenotípica clásica

Desde el descubrimiento de la primera bacteria láctica a finales del siglo XIX, las técnicas fenotípicas han sido la base del estudio microbiológico de este grupo de bacterias. Actualmente, los caracteres empleados por Orla-Jensen a principios del siglo XX aún tienen vigencia y permiten establecer una identificación presuntiva de estas bacterias, la cual deberá comprobarse por métodos moleculares (Vandamme *et al.*, 2014). La morfología bacteriana, la tinción de Gram, la reacción con la catalasa, la capacidad de esporulación, entre otras forman parte del protocolo a seguir para la identificación de las BAL después de haberse aislado de un cultivo puro procedente de un medio de cultivo sólido (Muñoz *et al.*, 2011). Posteriormente se debe probar la capacidad de fermentación de diferentes hexosas, para poder deducir si su metabolismo es homofermentativo o heterofermentativo (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). Con estas pruebas se logra una aproximación a nivel género. Para lograr una identificación a nivel especie, tradicionalmente se emplean las pruebas miniaturizadas API 50CHL (Biomérieux®), en donde se puede establecer la capacidad de la cepa bacteriana para la asimilación de 49 carbohidratos, obteniéndose perfiles específicos para cada especie. Sin embargo, aunque este método es muy empleado, algunos de los resultados no son totalmente confiables debido a que se encuentran grandes diferencias entre los perfiles de aislados pertenecientes a la misma especie, por lo que deben de ser acompañados por una identificación genotípica o molecular.

1.1.4.2 Identificación genotípica o molecular

Para este tipo de identificación que en la actualidad está ampliamente extendido se utiliza el ácido desoxirribonucleico (ADN) bacteriano (Heyndrick *et al.*, 1996). Existe una amplia variedad de técnicas moleculares que permiten la identificación a nivel género, especie, subespecie o incluso cepa a partir de un aislado de BAL (Muñoz *et al.*, 2011). Los métodos de identificación genotípica pueden clasificarse en dos tipos: aquellos que emplean técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los basados en hibridación.

Los métodos de identificación basados en PCR requieren de la obtención *in vitro* de una gran cantidad de copias de una secuencia génica mediante el empleo de la enzima polimerasa. Este gran número de copias es fácilmente identificado por una electroforesis. En la actualidad son numerosos genes los que se emplean para lograr la identificación microbiana, como el que codifica para el citocromo C, el gen *tuf*, o el ADN ribosómico 16S (Vandamme *et al.*, 2014). La función del ADN ribosómico, conformado por dos subunidades junto con las proteínas que conforman el ribosoma procariota es la traducción de las secuencias de ARN mensajero a proteínas, función vital para la sobrevivencia de la célula por lo que cualquier modificación en su estructura puede tener consecuencias metabólicas importantes o incluso la muerte del microorganismo. De forma concreta, la subunidad 16S del ARN ribosomal permite el reconocimiento de la secuencia Shine-Dalgarno del ARN mensajero, permitiendo tener la posición correcta del mismo para poder iniciar la traducción genética (Herráez, 2012). Se han empleado numerosos genes ribosómicos para la identificación bacteriana, así como en la determinación de su posición filogenética, como la subunidad 16S, la subunidad 23S o la subunidad 5S, siendo mayormente utilizada la subunidad 16S, debido a su menor tamaño cuando se compara con la subunidad 23S (Singh, *et al.*, 2009). Esta secuencia que cuenta con 1500 pares de bases, con dominios altamente conservados en ambos extremos del gen permite el diseño de primers o cebadores que permitan obtener el gen completo por PCR (Heyndrickx *et al.*, 1996), así como las regiones variables que permiten la identificación del organismo. Sin embargo, el uso de la secuencia 16S presenta una problemática para la correcta identificación de especies filogenéticamente cercanas, como algunas especies pertenecientes al género *Lactobacillus*. Un ejemplo, son las especies de *Lb. plantarum*, *Lb. paraplantarum* y *Lb. pentosus* (Singh *et al.*, 2009). Por esta razón se recomienda la utilización de varios genes para lograr la completa identificación de las especies microbianas.

Por otro lado, las técnicas basadas en hibridación tienen su fundamento en la capacidad de desnaturalización y renaturalización que tienen los ácidos nucleicos. Las hebras de ADN pueden ser separadas por medio de agentes

químicos, como la urea, formamida, ácidos o bases, o por efecto de la temperatura. La adición a la mezcla de reacción de otras moléculas de ADN o ARN, que, una vez neutralizadas las condiciones de desnaturalización, se unirán en mayor o menor grado con las dos hebras originales, produce la formación de tres posibles tipos de híbridos: los híbridos ADN-ADN, los híbridos ADN-ARN y los híbridos ARN-ARN, permitiendo con ello la localización de la secuencia de interés. El método basado en hibridación más utilizado es la hibridación fluorescente *in situ* (FISH), por sus siglas en inglés (Herráez, 2012).

1.1.5 Hábitats de las bacterias ácido-lácticas

Debido a la limitada capacidad biosintética de las BAL y a sus altos requerimientos de carbono y nitrógeno, los hábitats naturales de estas bacterias son ambientes ricos en nutrientes. Las BAL generalmente pueden ser aisladas a partir de fuentes animales o vegetales y de sus correspondientes alimentos fermentados, dentro de los que se incluyen productos lácteos, cárnicos hortofrutícolas y derivados de cereales. Algunas especies también pueden estar presentes en el tracto respiratorio, intestinal y vaginal de humanos y animales. La habilidad de colonizar estos ambientes dependerá directamente de su versatilidad metabólica (Klaenhammer *et al.*, 2005). Su amplia distribución en alimentos y así como la inocuidad de una gran cantidad de cepas, principalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus* ha llevado a que estas bacterias hayan sido utilizadas para conservación alimentos por medio de la fermentación, los cuales son ampliamente consumidos por los humanos.

1.1.6 Importancia de las BAL en la industria alimentaria

Las BAL han sido muy explotadas por la industria alimentaria por sus propiedades bio-conservantes para la elaboración de diversos productos alimenticios dentro de los cuales destacan productos cárnicos, productos lácteos, vegetales encurtidos y masas fermentadas, debido al proceso de acidificación de la materia prima, el cual puede coadyuvar a aumentar la vida de anaquel de estos productos. Por otro lado, en los últimos años, los consumidores buscan productos alimenticios sin conservadores químicos, esto ha presionado a la industria alimentaria hacia la búsqueda de sustancias de origen natural que impidan el

deterioro de los alimentos causado por microorganismos. Las BAL resultan ser los candidatos ideales para la ser utilizados en las fermentaciones alimentarias, debido al estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas, en inglés), de algunos de sus géneros, principalmente *Lactococcus* y *Lactobacillus*; además de que algunas cepas pueden producir diversos metabolitos con actividad biológica o con potencial inhibidor del crecimiento de ciertas bacterias y hongos.

En los últimos años ha tomado relevancia el empleo de cepas de BAL como agentes de biocontrol (control microbiológico). Este biocontrol presenta tres mecanismos principales: i) competencia por nutrientes, ii) reducción del pH del medio y iii) producción de sustancias con potencial antimicrobiano o antifúngico como ácido láctico, ácidos feniláctico, peróxido de hidrógeno, compuestos de origen proteico, como las bacteriocinas o péptidos antimicrobianos, entre otros (Reis *et al.*, 2012). A la producción de compuestos con actividad antimicrobiana o antifúngica por microorganismos se conoce como antibiosis (Leyva-Salas *et al.*, 2017). Como se puede observar los aspectos beneficiosos de las BAL son numerosos, y habitualmente, pueden presentarse durante el proceso de producción de producción de determinados alimentos, principalmente los alimentos y bebidas fermentados. A continuación, se describirán con mayor amplitud las propiedades antagónicas que presentan las BAL, así como el papel de estas en las fermentaciones alimentarias.

1.1.6.1 Papel de las BAL en los alimentos fermentados

Los alimentos fermentados tienen propiedades funcionales únicas debido a que pueden contener microorganismos con propiedades funcionales. Estos microorganismos pueden transformar los componentes presentes en un alimento durante la fermentación logrando aumentar: i) la biodisponibilidad de los nutrientes; ii) su inocuidad; iii) su vida de anaquel por la producción de compuestos antimicrobianos; y iv) sus características sensoriales debido a la formación de compuestos que imparten sabor, textura y olor (Tamang *et al.*, 2016). Dentro de estos microorganismos encontramos a las BAL.

Las bacterias ácido-lácticas son muy utilizadas para la producción de diversos alimentos fermentados, ya sea formando parte de un cultivo iniciador o bien

como parte de la microbiota autóctona del alimento. El empleo de las BAL para la elaboración como cultivo iniciador en la producción de alimentos fermentados ayudan a mejorar las características sensoriales (sabor, textura y olor), aumentan la calidad nutricional, y permitiendo su conservación por mayor tiempo. Esta acción conservante de las BAL se debe a la competencia por nutrientes entre estas bacterias y los microorganismos de descomposición, así como por su capacidad productora de metabolitos con actividad antimicrobiana (Ramírez-Ramírez *et al.*, 2011).

En los últimos años se ha visto que las BAL, además de mejorar la calidad sensorial y nutricional de los alimentos fermentados, pueden producir compuestos que pueden ejercer diversas actividades en el organismo, como los péptidos bioactivos, además de que algunas cepas pueden tener propiedades probióticas. También las BAL pueden producir una gran cantidad de compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica, sin embargo, en este trabajo solo nos centraremos en la producción de los compuestos que ejercen un efecto antifúngico, los cuales son serán descritos posteriormente. En la Figura 1.4 se muestran las principales funciones que pueden realizar las BAL en los alimentos fermentados.



FIGURA 1.4. Principales funciones realizadas por las BAL en los alimentos fermentados

1.1.6.2. Propiedades antagónicas de las bacterias ácido lácticas

En los últimos años se ha puesto en evidencia que las bacterias ácido-lácticas tienen propiedades antagónicas que ofrecen protección contra hongos y bacterias que provocan el deterioro de los alimentos (Messens y De Vuyst, 2002). Estas propiedades antagónicas han sido asociadas a una amplia gama de compuestos antimicrobianos activos producidos durante la fermentación bacteriana, como por ejemplo, ácido láctico, ácido acético, ácido benzoico, dióxido de carbono, etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas (Lavermicocca *et al.*, 2000; Messens y De Vuyst, 2002; Ström *et al.*, 2002; Lind *et al.*, 2007; Hassan y Bullerman, 2008; Dalié *et al.*, 2010).

1.1.6.3. Actividad antifúngica de las bacterias ácido-lácticas

Las BAL pueden ejercer su efecto antifúngico mediante tres mecanismos principales: i) competencia por nutrientes, ii) reducción del pH del medio, y iii) producción de metabolitos con potencial antifúngico. El control del deterioro producido por hongos por medio de microorganismos antagónicos con potencial antifúngico es un proceso complejo que depende de tres elementos principales: i) las condiciones de la materia prima o alimentos (factores abióticos y bióticos), ii) las características fisiológicas y bioquímicas del hongo, y iii) las características de los microorganismos antagónicos y/o compuestos con actividad antifúngica (Magnusson *et al.*, 2003; Leyva Salas *et al.*, 2017). En la Figura 1.5, puede observarse lo descrito anteriormente.

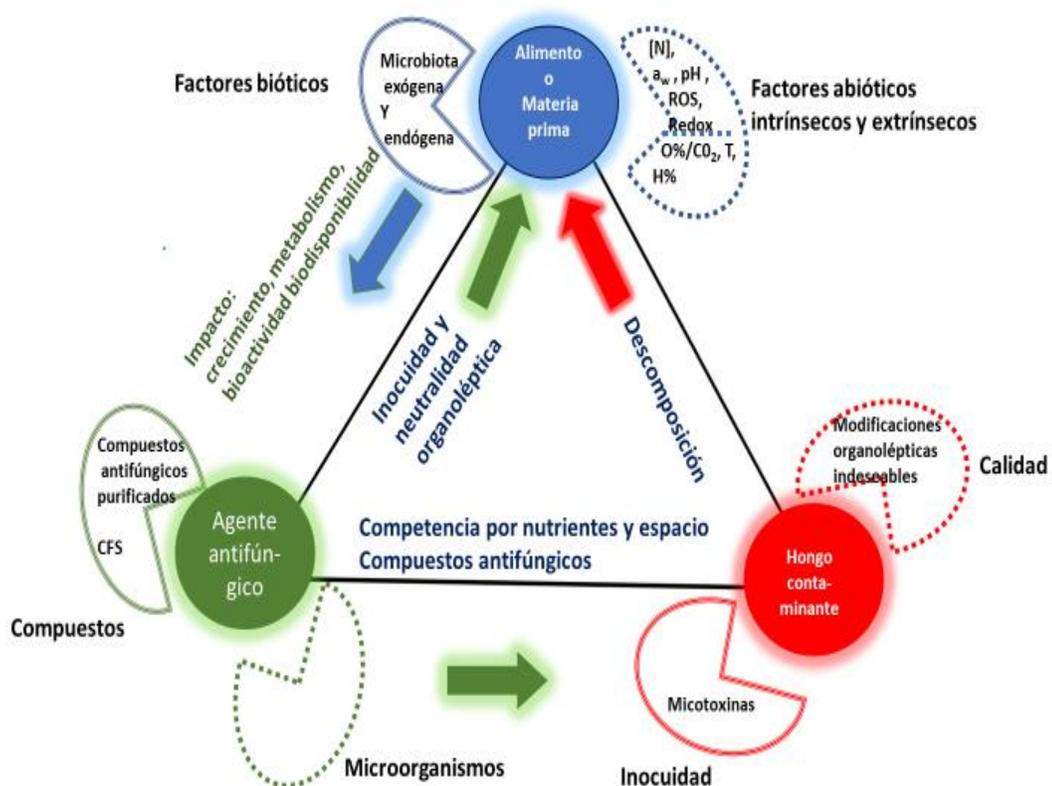


FIGURA 1.5. Relación existente entre el alimento-hongo-agente antifúngico.

Adaptada de Leyva *et al.*, 2017

Los compuestos antifúngicos pueden presentar: i) un mecanismo de acción específico, como la natamicina, la cual bloquea el crecimiento del hongo por medio de una interacción específica con el ergosterol de la membrana, o ii) un mecanismo no específico, como las moléculas que generan condiciones de estrés (ácido u osmótico) a los hongos (Leyva-Salas *et al.*, 2017). A continuación, se describen algunas de las investigaciones más sobresalientes de la producción de compuestos con actividad antifúngica por bacterias ácido-lácticas realizados en la última década.

Djossou *et al.* (2011) estudiaron el efecto antifúngico que presentan algunas cepas de BAL aisladas de la cereza de café sobre el crecimiento de *Aspergillus carbonarius* durante el almacenamiento del café Robusta. Los autores demostraron que diez cepas de BAL identificadas como *Lb. plantarum* tuvieron un efecto antagonista contra la cepa fúngica evaluada (*A. carbonarius*), uno de los principales productores de ocratoxinas durante el almacenamiento de café, y por lo tanto alguna de estas cepas de BAL pueden ser utilizadas para evitar el crecimiento de hongos toxigénicos durante el almacenamiento del café.

Cortés-Zavaleta *et al.* (2014) realizaron un estudio para determinar la relación existente entre la actividad antifúngica y la habilidad productora de ácido-3-fenil láctico durante el crecimiento en medio MRS (de Man Rogosa Sharpe) de bacterias ácido-lácticas. Se probó la actividad antifúngica y la capacidad productora de ácido-3-fenil-láctico de trece cepas de BAL, dentro de las cuales se encontraban cinco cepas de *Lb. casei*, dos cepas de *Lb. rhamnosus*, dos cepas de *Lb. fermentum*, una cepa de *Lb. acidophilus*, una cepa de *Lb. plantarum*, una cepa de *Lb. sakei* y una cepa de *Lb. reuteri*. Se demostró que las cuatro especies de hongos probadas en este estudio (*Colletotrichum gloesporoides*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Aspergillus flavus* presentaban diferentes grados de sensibilidad frente a los sobrenadantes libres de células de cada una de las fermentaciones realizadas con las BAL antes mencionadas. También se observó que la actividad antifúngica de las BAL no sólo se debía a la producción del ácido 3-fenil-láctico, sino que se trataba de un efecto sinérgico de varios compuestos producidos durante la fermentación por estas bacterias.

En ese mismo año Li *et al.* (2014), evaluaron la actividad antifúngica y el efecto que tiene el extracto libre de células de *Lactobacillus casei* AST18 sobre la morfología del micelio de *Penicillium chrysogenum*. En este estudio se demostró que la cepa de *Lb. casei* AST18 tenía la capacidad de inhibir el crecimiento de *P. chrysogenum*. Además, por medio de imágenes obtenidas por microscopia electrónica de barrido también se pudo observar que la morfología del micelio se alteraba por efecto del extracto libre de células de BAL utilizada en este estudio.

Posteriormente, en un estudio realizado por Varsha *et al.* (2015) se demostró la capacidad productora de compuestos antifúngicos por una cepa de *Lactococcus sp.* previamente aislada. Se demostró que el compuesto 2,4- di-tert-butil-fenol producido durante el crecimiento de esta cepa en medio MRS (de Man Rogosa Sharpe) presentó actividad antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum* y *Penicillium chrysogenum*.

En un estudio realizado por Romanens *et al.* (2019), se caracterizaron levaduras y BAL previamente aisladas de diferentes etapas de la postcosecha del cacao, con el objetivo de seleccionar a los microorganismos con capacidad adaptativa durante la simulación de un proceso de fermentación, y así poder desarrollar un co-cultivo levadura BAL. Dentro de las pruebas realizadas se encontraban las pruebas de actividad antifúngica in vitro e in vivo, evaluación del metabolismo de carbono, así como pruebas de tolerancia al estrés empleando un medio de simulación a base de pulpa de cacao. Los autores encontraron que las cepas de *Lb. fermentum* (M017 y 223), *Hanseniaspora opuntiae* (H17) y *Saccharomyces cerevisiae* (H290) fueron las que mostraron tener una mayor capacidad antifúngica contra cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Gibberella*, además de que mostraron tener una mayor adaptación metabólica a las condiciones que se encuentran durante el proceso de fermentación del cacao. La cepa con mayor capacidad antifúngica fue *Lb. fermentum* 223 mostró inhibir en un 75 % el crecimiento del hongo, por lo que podría ser empleada en la formulación de co-cultivos con actividad antifúngica. Finalmente, los autores concluyen que *Lactobacillus fermentum* (M017 y 223), *Hanseniaspora opuntiae* (H17) y *Saccharomyces cerevisiae* (H290) son los microorganismos más adecuados para el

desarrollo de co-cultivos para limitar el crecimiento de hongos filamentosos y la producción de micotoxinas durante el proceso de fermentación del grano de cacao. En ese mismo año, Ruggirello et al. (2019) demostraron la capacidad antifúngica de cepas de levaduras y BAL aisladas del proceso de fermentación del cacao contra seis cepas de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* (*A. flavus*, *P. citrinum*, *P. griseofulvum*, *A. niger* y *A. fumigatus*), los cuales fueron aislados de granos de cacao secos. Las cepas microbianas que presentaron mayor actividad antifúngica fueron *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida ethanolica*, la cual fue mayormente atribuida a la producción de ácidos orgánicos en el caso de las bacterias ácido-lácticas y a compuestos de origen proteico en el caso de las levaduras o incluso a un efecto sinérgico.

Estos trabajos ponen de manifiesto la capacidad de las bacterias ácido-lácticas aisladas de diferentes matrices alimentarias para la producción de compuestos con actividad antifúngica, sin embargo, no se han realizado estos estudios con BAL aisladas durante el proceso de fermentación del cacao en México. Es por ello, que es importante estudiar el potencial antifúngico de las cepas de BAL autóctonas del proceso de fermentación mexicano.

1.1.6.4. Principales compuestos con actividad antifúngica producidos por las BAL

Como ya se ha mencionado, algunas cepas de BAL tienen la habilidad de producir compuestos que presentan una actividad antifúngica. La producción de compuestos con actividad antifúngica (antibiosis) y el descenso del pH del medio son los factores principales que contribuyen con el efecto antifúngico en alimentos (Leyva-Salas et al., 2017). Se ha logrado purificar varios compuestos con actividad antifúngica, los cuales fueron producidos durante la fermentación con BAL. La mayoría de estos compuestos tienen bajo peso molecular dentro de los cuales podemos mencionar: ácidos orgánicos, reuterina, peróxido de hidrogeno, compuestos de origen proteico y ácidos grasos hidroxilados. Los compuestos con

potencial antifúngicos producidos durante la fermentación con BAL aisladas de fuentes alimentarias se muestran en la Tabla 1.1

Tabla 1.1 Principales compuestos con actividad antifúngica producidas durante la fermentación por cepas de BAL aisladas de alimentos

Cepa de BAL	Alimento del que fue aislada	Compuesto antifúngico	Referencia
<i>Lb. sanfranciscensis</i> CB1	Masa agria	Ácido caproico, ácido propiónico, ácido butírico y ácido valérico	(Corsetti <i>et al.</i> , 1998)
<i>Lb. plantarum</i> VTT E-78076	Cerveza	Ácido benzoico metilhidantoína, mevalonolactona, ciclo (Gly-L-Leu) 3-fenil-láctico	(Niku-Paavola <i>et al.</i> , 1999)
<i>Lb. plantarum</i> 21B	Masa agria	Ácido 3-fenil-láctico (PLA), Ácido 4-hidroxi-fenil-láctico	(Lavermicocca <i>et al.</i> , 2000)
<i>Lb. mali</i> VLT112, <i>Lb. pentosus</i> VLT310	Salami	Compuestos peptídicos	(Coloretti <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lb. plantarum</i> FST 1.7	Cebada malteada	Ácido láctico, PLA, ciclo(L-Leu-L-Pro) y ciclo (L-Phe- L-Pro)	(Dal Bello <i>et al.</i> , 2007)
<i>Lb. reuteri</i> CRL1100, <i>Lb. brevis</i> CRL 772 y CRL796	Masa agria	Ácidos orgánicos	(Gerez <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lb. brevis</i> PSI	Cebada malteada	Ácidos orgánicos y compuestos de origen proteico	(Mauch <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lb. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Yogurt y queso feta	Compuestos parecidos a las bacteriocinas	(Voulgari <i>et al.</i> , 2010)

Cepa de BAL	Alimento del que fue aislada	Compuesto antifúngico	Referencia
<i>Lb. plantarum</i>	Kimchi	Cicio (Leu-Leu) y δ -dodecalactona	(Yang y Chang, 2010; Yang, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lb. plantarum</i>	Yuca fermentada	Ácido 2-hidroxi-4 metilpentanoico	(Ndagano, <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lb. helveticus</i>	Producto lácteo	Ácidos orgánicos	(Bian <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lb. sakei subsp. ALIO33</i>	Kimchi	Ácidos orgánicos	(Huh y Hwang, 2016)
<i>Pd. Pentosaceus</i>	Productos lácteos	Antioxidantes fenólicos	(Sellamani <i>et al.</i> , 2016)
<i>Lb. paracasei</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. fermentum</i>	Queso	Ácidos orgánicos	(Fernandez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i>	Productos fermentados tradicionales andinos	PLA y ácidos 3,5-Di-O-cafeoilquínicos	(Yépez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lb. rhamnosus</i>	Productos lácteos tradicionales	Compuestos de origen proteico	(Bazukyan <i>et al.</i> , 2018)
<i>Lb. fermentum</i>	Granos de cacao	Ácidos orgánicos	(Romanens <i>et al.</i> , 2019)
<i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i>	Granos de cacao	Ácidos orgánicos	(Ruggirello <i>et al.</i> , 2019)

La producción de estos compuestos con actividad antifúngica depende de la cepa de BAL empleada, así como de los factores del medio de fermentación como el pH, la temperatura, el tiempo de incubación, el medio de crecimiento empleado, presencia de factores nutricionales (NaCl, CaCl₂, glucosa, extracto de levadura)

entre otros. En algunos estudios, se ha reportado que la máxima actividad antifúngica encontrada de *Lactobacillus plantarum* CUK501 fue a una temperatura de 30°C durante el final de su fase logarítmica (Sathe *et al.*, 2007). El empleo de factores nutricionales como la adicción de NaCl, CaCl₂, glucosa o extracto de levadura puede aumentar la tasa de producción de compuestos con actividad antifúngica (Dalie *et al.*, 2010). Se ha visto que la producción de compuestos antifúngicos producidos por algunas BAL se ve aumentado cuando el pH del medio de fermentación se encuentra en un rango de pH entre 5.5 y 7. Sin embargo el efecto que tiene el pH sobre la producción de compuestos con actividad antifúngica durante la fermentación con cepas de BAL también depende de otros factores como la temperatura y tiempo de incubación, la cepa de hongo y la presencia de microbiota competidora (Dalie *et al.*, 2010).

1.1.6.4.1 Principales características y mecanismo de acción de los compuestos con potencial antifúngico

Los principales compuestos con actividad antifúngica estudiados son el ácido fenil-láctico, ácidos orgánicos, compuestos de naturaleza proteica, peróxido de hidrógeno, ácidos grasos y compuestos de naturaleza variada (Crowley *et al.*, 2013a). En la Figura 1.6 se muestran las principales características de los principales compuestos con actividad antifúngica producidos por las BAL.

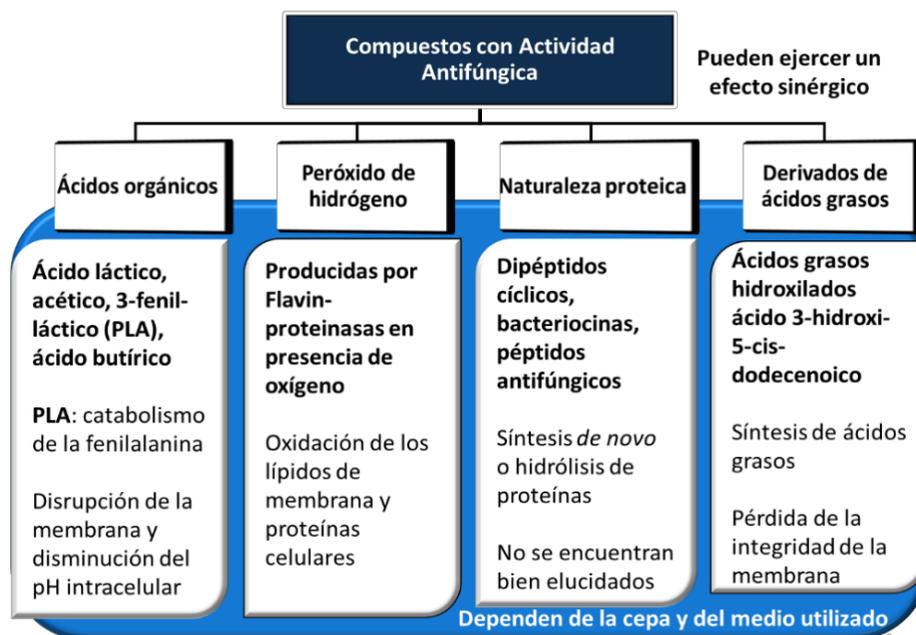


FIGURA 1.6. Principales características de los compuestos antifúngicos producidos por las BAL (Dalie *et al.*, 2010; Crowley *et al.*, 2013a; 2010; Sadiq *et al.*, 2019).

1.1.6.4.2 Ácidos orgánicos

Durante su metabolismo las BAL pueden producir diversos ácidos orgánicos como el láctico, acético, propiónico, entre otros, los cuales disminuyen el pH del medio de crecimiento y es así como contribuyen a la inhibición de microorganismos. La concentración y tipo de ácidos producidos durante las fermentaciones dependerá de la cepa de BAL empleada, así como de la composición del medio de fermentación utilizado y las condiciones de crecimiento, siendo el ácido láctico el que se produce en una mayor cantidad (Ammor *et al.*, 2006)

El ácido láctico puede producirse por la vía homofermentativa y heterofermentativa de las BAL y puede interactuar con las membranas celulares causando la acidificación intracelular y desnaturalización proteica. La forma no disociada del ácido es tóxica para hongos, levaduras y bacterias, siendo el esteroisómero L-láctico el que tiene una mayor capacidad inhibitoria (Ouweland y Vesterlung, 2004).

El ácido acético es producido por las BAL heterofermentativas y puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización proteica. Tiene mayor eficiencia como agente antimicrobiano (levaduras, bacterias y hongos) que el ácido láctico, debido que posee un mayor valor de pKa (4.75) que el ácido láctico (pKa 3.86) (Mani-López *et al.*, 2012). Cuando se tienen mezclas de ácido láctico y acético se ha encontrado que el ácido láctico produce un descenso en el pH, incluso llegando a valores menores que el pKa del ácido acético, lo cual aumenta la proporción de la forma no disociada del ácido acético, y de esta manera se potencializa su efecto (Adams y Nicolaidis, 1997). Además cuando se utiliza ácido láctico con algún otro compuesto con potencial antimicrobiano se puede tener un efecto sinérgico, ya que el ácido láctico tiene la capacidad de permeabilizar membranas y por lo tanto mejora el efecto de otras sustancias antimicrobianas como las bacteriocinas (de Freire-Bastos *et al.*, 2011).

1.1.6.4.3. Ácido 3- fenil-láctico

El ácido 3-fenil-láctico (PLA), cuya fórmula molecular es $C_9H_{10}O_3$ (PM=166 g/mol), es un ácido orgánico que se encuentra en los productos fermentados con bacterias ácido-lácticas y en la miel (Mu *et al.*, 2012). Este ácido se produce como subproducto del metabolismo de la fenilalanina. Este ácido tiene la capacidad de retrasar el crecimiento de muchas especies de hongos, como *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* (Lavermicocca *et al.*, 2003; Gerez *et al.*, 2009; Yépez *et al.*, 2017), siendo uno de los compuestos antifúngicos producidos por las bacterias ácido-lácticas más estudiados (Crowley *et al.*, 2013a). La capacidad de producción de PLA por cepas de BAL fue por primera vez descrita por Lavermicocca *et al.* (2000), quienes purificaron este compuesto a partir del extracto libre de células de una cepa de *Lb. plantarum*. En este estudio se demostró que este compuesto evitaba el deterioro de un pan elaborado con masa fermentada con *Saccharomyces cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* en comparación con un pan elaborado con la masa fermentada solo por *S. cerevisiae*, la cual mostró crecimiento de *Aspergillus niger* FTDC3227. En un estudio posterior, Lavermicocca *et al.*, 2003) observaron que para lograr la inhibición en un 90% del crecimiento de hongos en productos de panificación elaborados con masa agria se requerían de concentraciones de PLA

menores a 7.5 mg/mL. El PLA mostró un efecto inhibitorio contra 14 especies de hongos, incluidas algunas especies toxigénicas, como *Penicillium citrinum*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium verrucosum* y *Penicillium roqueforti*. Posteriormente, en un estudio realizado por Gerez *et al.* (2009) se demostró que el ácido 3-fenil-láctico presentaba una mayor efectividad que el ácido propiónico, acético y láctico contra *A. niger* y *F. graminearum*.

Se ha reportado que el ácido 3-fenil-láctico puede ser producido durante el crecimiento de diferentes especies de BAL en MRS en concentraciones que van de 0.1 a 1.6 mM (Zhang *et al.*, 2014). Esta concentración de PLA es menor al valor determinado de MIC (con PLA comercial) encontrado por Cortés-Zavaleta *et al.* (2014) para la inhibición del crecimiento fúngico (*Colletotrichum gloeosporioides*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* y *Aspergillus flavus*), cuyos valores se encontraban en el rango de 3.01 a 36.10 mM. Sin embargo, aunque un existe un consenso sobre la concentración de PLA necesaria para lograr la inhibición en el crecimiento fúngico, la concentración producida por las BAL no es suficiente para lograr la inhibición. Por esta razón, diversos autores han tenido un progreso apreciable en la producción de PLA con diferentes especies de BAL por medio de la optimización de las condiciones de crecimiento (Lavermicocca *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2014; Bustos *et al.*, 2018)

1.1.6.4.4. Peróxido de hidrógeno

Las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante la acción enzimática de la flavoproteína oxidasa o NADH peroxidasa, sin embargo, las fermentaciones con producción de ácido láctico son esencialmente reacciones anaeróbicas por lo que la formación de peróxido de hidrógeno será limitada debido a la cantidad de oxígeno disuelto disponible en la fermentación. Su efecto antimicrobiano se debe a la oxidación de los grupos sulfhidrilo causando la desnaturalización proteica, además de la peroxidación de las membranas lipídicas, aumentando la permeabilidad de la membrana. El H₂O₂ también puede ser un precursor para la producción de radicales libres como son el superóxido (O₂⁻) e hidroxilo (OH⁻), los cuales causan daños en el DNA (Hertzberger *et al.*, 2014).

1.1.6.4.5. Compuestos proteicos

Se sabe que las bacterias ácido-lácticas tienen la capacidad de producir bacteriocinas y/o péptidos antimicrobianos, que actúan sobre bacterias Gram positivas y en algunos casos sobre Gram negativas, los cuales participan en la conservación de una gran cantidad de alimentos (Sabo *et al.*, 2019). Sin embargo, existen solo algunos estudios que documentan la producción de compuestos de origen proteico por BAL con actividad antifúngica como los estudios realizados por Coloretti *et al.* (2007), Coda *et al.* (2011), Rizzello *et al.* (2011), y Bazukyan *et al.* (2018). La mayor parte de estos compuestos de origen proteico con actividad antifúngica son producidos por cepas de BAL pertenecientes al género de *Lactobacillus* (Coloretti *et al.*, 2007; Coda *et al.*, 2011; Rizzello *et al.*, 2011; Bazukyan *et al.*, 2018), aunque también se ha reportado su producción por *Lactococcus* y *Pediococcus* (Batish *et al.*, 1989; Digaitiene *et al.*, 2012)

También se ha observado que algunas cepas de *Lactobacillus plantarum* tienen la capacidad de producir péptidos cíclicos, como cis-ciclo-(Val-Pro) y cis-ciclo-(Phe-Pro), las cuales poseen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de del crecimiento de *Ganoderma boninense* (Kwak *et al.*, 2014).

En otro estudio se ha reportado que algunos péptidos bioactivos producidos por *Lactobacillus plantarum* poseen actividad antifúngica *in vitro* contra *Aspergillus parasiticus* y *Penicillium expansum*. Las secuencias de estos péptidos son las siguientes: SGADTTFLTK, LVGKKVQTF y GTLIGQDYK (Luz *et al.*, 2017).

1.1.6.4.6. Ácidos grasos

Algunos ácidos grasos poseen actividades antimicrobianas y antifúngicas. Se ha observado que la longitud de la cadena juega un papel importante en el mecanismo antimicrobiano siendo los ácidos grasos con cadena larga los que presentan un mejor efecto inhibitorio (Bergsson *et al.*, 2001; Crowley *et al.*, 2013a).

En un estudio realizado por Sjögren *et al.* (2003) se demostró que cuatro ácidos grasos hidroxilados (ácido 3-(R)-hidroxidecanoico, ácido 3-hidroxi-5-cis-dodecenoico, ácido 3-hidroxidodecanoico y ácido 3-hidroxitetradecanoico)

producidos *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 presentaron actividad antifúngica contra levaduras (*Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala* y *Rhodotorula mucilaginosa*) encontrándose valores de concentración mínima inhibitoria (MIC) que van de 10 a 100 µg/L. En otro estudio realizado por Ndagano *et al.* 2011 se encontró que el extracto libre de células de *Lb. plantarum* WE56 y *Weissella* para mesenteroides LC11 presentó un efecto antifúngico contra cepas de *A. niger*, *A. tubingensis*, *P. crustosum*. Este efecto es atribuido al efecto sinérgico de ácido 2-hidroxi-4-metilpentanoico y otros ácidos orgánicos, láctico, ácido acético y fenil-láctico.

1.1.6.4.6. Otros tipos de compuestos

La reuterina (β -hidroxipropanaldehído) es una sustancia antimicrobiana que posee un peso molecular de 74 Da. Este compuesto se produce por cepas de *Lactobacillus reuteri*, que son bacterias ácido-lácticas heterofermentativas y anaerobias. La reuterina posee un amplio espectro de inhibición, ya que actúa contra bacterias Gram positivas y negativas, hongos, levaduras y protozoos (Ouwehand y Vesterlung, 2004).

Se ha reportado la producción de lactonas por cepas de BAL con potencial antifúngico, como la estudiada por Niku-Paavola *et al.* 1999. En este estudio se reportó que la cepa de *Lb. plantarum* VTT E-78076 producía mevanolactona, la cual mostró tener una actividad inhibitoria del contra el crecimiento de *Fusarium avenaceum* del 10%.

1.2 La fermentación del cacao y las bacterias ácido-lácticas

1.2.1 Fermentación del grano de cacao

La fermentación de los granos de cacao es esencial para eliminar la pulpa que envuelve a estos y así como para desarrollar los precursores del sabor característico del chocolate (Fowler, 2009; Thompson *et al.*, 2013). Los azúcares y polisacáridos que se encuentran presentes en la pulpa de cacao son fermentados por microorganismos, produciendo metabolitos y las condiciones necesarias que conducen a la muerte del grano por medio de una serie de reacciones bioquímicas. A partir de estas reacciones bioquímicas que se llevan a cabo dentro del grano de

cacao se generan los compuestos precursores de sabor y olor característicos del chocolate. Estos sabores se desarrollan completamente durante las etapas del tostado y conchado del proceso de elaboración del chocolate (Schwan y Wheals, 2000; Afoakwa *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2015).

La fermentación de los granos de cacao se realiza de forma espontánea en beneficiadoras, lo cual conlleva a la obtención de granos de cacao fermentados de calidad heterogénea. Generalmente se lleva a cabo en sacos, montones, cajas, charolas y plataformas. La duración del proceso fermentativo es de 2 a 10 días dependiendo de las prácticas y condiciones utilizadas en la beneficiadoras (De Vuyst y Weckx, 2015; Schwan *et al.*, 2015).

La microbiota implicada en el proceso de fermentación ha sido estudiada por diversos autores, en estos estudios se ha puesto de manifiesto una posible sucesión microbiana y el impacto de esta en la calidad del producto final (Schwan y Wheals, 2004; Pereira *et al.*, 2012). Al inicio de la fermentación el bajo valor de pH de la pulpa debido al contenido de ácido cítrico y la baja disponibilidad de oxígeno favorecen el crecimiento de levaduras. Por lo tanto, las levaduras se desarrollan durante este periodo produciendo etanol y degradando la pectina disponible (fase 1). Posteriormente, existe un decremento en su población, lo cual favorece al crecimiento de las bacterias ácido-lácticas (BAL), las cuales alcanzan su máximo crecimiento alrededor de la hora 36 de fermentación (fase 2). Las BAL convierten la glucosa disponible a ácido láctico. Después de las 48 horas, el crecimiento de las bacterias ácido-lácticas comienza a disminuir. Simultáneamente, empiezan a aumentar la cantidad de bacterias acéticas (BA), las cuales oxidan el etanol a ácido acético. Este ácido es el causante del incremento de la temperatura por arriba de 50°C (fase 3). La elevación de la temperatura, la disminución del pH (de 6.5 a 4.8) y la penetración del ácido acético y etanol al grano son los causantes de la muerte del grano de cacao (Ardhana y Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2005; Camu *et al.*, 2007; Cleenwerck *et al.*, 2008; Daniel *et al.*, 2009; Garcia-Armisen *et al.*, 2010). A continuación, se muestran en la Figura 1.6 las principales fases de la fermentación del cacao.



FIGURA 1.7. Principales fases de la fermentación del grano de cacao.
(Papalexandratou *et al.*, 2013; Schwan *et al.*, 2015)

Las principales levaduras involucradas en el proceso de fermentación del cacao pertenecen a los géneros *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulopsis*, y *Saccharomyces*, estas varían de acuerdo al sistema de fermentación utilizado y el ambiente en donde se realiza el proceso (Schwan y Wheals, 2004). Con respecto, a las bacterias ácido-lácticas que se encuentran generalmente presentes en la fermentación del grano de cacao destacan los siguientes géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*. Cabe destacar, que no es deseable para la calidad del grano de cacao fermentado que se produzca una gran cantidad de ácido láctico, ya que este tiene una baja volatilidad y es difícil expulsarlo del grano durante el secado (García-Díaz, 2013). Por último, los principales géneros de bacterias acéticas involucradas en el proceso de fermentación del cacao, son: *Acetobacter* y *Gluconobacter* (Schwan y Wheals, 2004).

La producción del etanol por el crecimiento de las levaduras y la producción de ácido acético por las bacterias ácido-acéticas, así como el aumento de la

temperatura entre 45 a 50°C provocan la muerte del grano de cacao debido a una serie de reacciones bioquímicas provocadas por el ingreso de los metabolitos antes mencionados. Estas reacciones bioquímicas que suceden en el interior del grano son necesarias para lograr una fermentación exitosa del grano y para el desarrollo de los sabores y olores característicos del chocolate. Otro factor muy importante es la disminución del pH interno del grano de cacao, el cual tiene un pH =7, antes del proceso de fermentación y debe disminuir a un valor entre 5.0 y 5.5 para permitir que las proteasas endógenas del grano tengan una actividad óptima y degraden las proteínas presentes en el grano y así produzcan los compuestos precursores de sabor del chocolate (Ho *et al.*, 2015).

1.2.1.1 Importancia de las BAL en la fermentación del cacao

Las BAL se están asociadas al proceso fermentativo del grano de cacao, generalmente se encuentran en concentraciones de 10^7 - 10^8 UFC / g entre las 36 a 48 horas de fermentación (Lima *et al.*, 2011, Schwan *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2013). Si bien se han encontrado una diversidad de especies de BAL en este ecosistema, las especies de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* son las que se encuentran con una mayor frecuencia (Ardhana y Fleet, 2003; Nielsen *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008; Kostinek *et al.*, 2008; Lefeber *et al.*, 2011a; Papalexandratou *et al.*, 2011a; 2011c; 2013).

De Vuyst y Weckx (2015) han revisado la ecología, las actividades metabólicas y las funciones potenciales de las BAL durante las fermentaciones del grano de cacao, encontrándose que las BAL realizan tres actividades principales durante este proceso fermentativo: (i) fermentan los azúcares disponibles en la pulpa, principalmente glucosa y fructosa, produciendo principalmente ácido láctico y cantidades menores de etanol y ácido acético; (ii) utilizan ácido cítrico que se encuentra disponible en la pulpa para producir principalmente ácido láctico, ácido acético, acetaldehído, diacetilo, acetoína y 2,3-butanodiol; y (iii) algunas especies pueden reducir la fructosa de la pulpa a manitol, lo cual fue observado en otras investigaciones (Camu *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008a; Camu *et al.*, 2008b; Lefeber *et al.*, 2011a; De Vuyst y Weckx, 2015). Los procesos de simulación del proceso del

cacao, los cuales emplean utilizan medios de pulpa de cacao y cultivos puros de BAL aisladas del mismo proceso confirman dicho comportamiento metabólico (Lefeber *et al.*, 2010, 2011a; Adler *et al.*, 2013; Moens *et al.*, 2014 ; Ho *et al.*, 2015).

Con el fin de reconocer la relevancia de las BAL en este proceso fermentativo, se han realizado varios experimentos utilizando cepas seleccionadas de *L. plantarum* y *L. fermentum* como cultivos iniciadores, pudiendo estar en combinación con levaduras y bacterias ácido-acéticas. Estos cultivos iniciadores son utilizados para conducir el proceso fermentativo y mejorar los parámetros de calidad del grano de cacao fermentado (Schwan 1998; Lefeber *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2012). Sin embargo, ninguno de estos estudios ha proporcionado aún no ha brindado una mayor información acerca papel específico de las BAL en la fermentación del grano de cacao y los indicadores de calidad.

1.3 Ecología microbiana en la fermentación del cacao

La ecología microbiana de la fermentación del cacao es compleja e implica sucesiones microbianas de diversas especies de levaduras, bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido acéticas y, posiblemente, algunas especies de bacilos esporulados, otros géneros bacterianos y hongos filamentosos (Ardhana y Fleet, 2003; Schwan y Wheals, 2004; Lima *et al.*, 2011; Thompson *et al.*, 2013; De Vuyst y Weckx, 2015).

Dentro de las levaduras, *Hanseniaspora guilliermondii* o *Hanseniaspora opuntiae* generalmente dominan la parte inicial de la fermentación, posteriormente se ha reportado a *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia kudriavzevii* y algunas *Candida spp.* como dominantes (Ardhana y Fleet, 2003; Jespersen *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2005; Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Daniel *et al.*, 2009; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). En el caso de las bacterias ácido-lácticas, se ha reportado que *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus fermentum* se desarrollan con mayor frecuencia, aunque a veces se han encontrado algunas especies de *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Nielsen *et al.*, 2007; Camu *et al.*, 2008; Kostinek *et al.*, 2008; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Para el caso de las bacterias ácido acéticas se ha visto que *Acetobacter*

pasteurianus es la principal representante de este género en este proceso fermentativo, sin embargo, también se ha reportado la presencia de especies como *Gluconobacter oxydans*, *Acetobacter tropicalis*, *Acetobacter lovaniensis* y *Acetobacter syzygii* (Ardhana y Fleet, 2003; Camu *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2007; Lefeber *et al.*, 2011b; Ho *et al.*, 2015).

También se ha reportado la presencia de algunas bacterias del género *Bacillus* durante las 48 y 60 horas de fermentación, encontrándose principalmente a *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *B. pumilus* e incluso *B. subtilis*. La alta temperatura que se logra alcanzar durante el proceso fermentativo favorece el crecimiento de estas bacterias que pueden catalizar diversas reacciones que producen sabores y olores desagradables en el grano pero que también podrían contribuir con la formación de ácidos orgánicos y compuestos como el 2,3 butanodiol, que imparte sabor (Ardhana y Fleet, 2003; Ouattara *et al.*, 2008; Wacher, 2011; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019).

Por otro lado, en diversos estudios se ha reportado la presencia de hongos filamentosos en la superficie de la masa fermentativa durante los últimos días de fermentación del grano de cacao (Schwan y Wheals, 2004; Copetti *et al.*, 2013), sobre todo cuando la remoción de la masa fermentativa no se realiza correctamente. Por otro lado, los hongos filamentosos también pueden ser observados dentro de las cajas de fermentación, cuando se lleva a cabo la agitación de la masa fermentativa. El papel que tienen los hongos en el proceso no está bien definido, sin embargo, se conoce que algunas especies pueden causar la hidrólisis de la pulpa, produciendo sabores extraños y altera el sabor característico del grano de cacao (Ardhana y Fleet, 2003; Schwan y Wheals, 2004). El desarrollo de hongos al final de la fermentación y provocan un mayor deterioro del grano durante la fase de secado (Gilmour y Lindblom, 2008).

Después de estudiar la ecología microbiana de la fermentación de cacao en cajas de madera en Indonesia, Ardhana y Fleet (2003) observaron la presencia de *Penicillium citrinum* y un basidiomiceto no identificado en las primeras 36 h de fermentación. Ambos hongos mostraron una fuerte actividad de poligalacturonasa,

sugiriendo que puede tener un papel en la degradación de la pulpa de cacao durante las primeras etapas de fermentación. También se ha reportado la presencia de *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus wentii* y *Penicillium purpurogenum* (Ardhana y Fleet, 2003; Copetti *et al.*, 2014).

Sin embargo, la preocupación principal es que exista presencia de hongos filamentosos productores de micotoxinas (ocratoxinas, aflatoxinas, entre otras) o toxigénicos durante la fermentación y otras etapas de la cadena productiva del cacao. Se ha reportado la presencia de hongos filamentosos productores de ocratoxina A en granos de cacao fermentados mediante fermentación en la caja y pila, las cuales fueron realizadas en Camerún, las principales especies encontradas fueron *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, productores de ocratoxina A (Mounjouenpou *et al.*, 2008), siendo las mazorcas dañadas las más susceptibles a la contaminación por este tipo de hongos. Además se ha reportado la presencia de otras especies de *Aspergillus* como *A. flavus*, *A. parasiticus* y *A.* (Copetti *et al.*, 2011; Copetti *et al.*, 2012; Orole, 2016).

1.4 Ocurrencia de hongos toxigénicos en la fermentación y en otras etapas de la cadena productiva del cacao

Como ya se mencionó previamente se ha reportado la presencia de algunos productores de micotoxinas durante la fermentación del grano de cacao. Copetti, *et al.* (2011) reportaron la presencia de especies productoras de aflatoxinas en diversas muestras de fermentaciones de granos de cacao. Las especies encontradas fueron *Aspergillus niger* y *Aspergillus parasiticus*. En otros estudios realizados se detectaron especies de *A. niger* y *A carbonarius* productores de ocratoxina A (Mounjouenpou *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe recalcar que estos hongos toxigénicos solo estuvieron presentes en el 5% de las muestras totales utilizadas en los estudios (Copetti *et al.*, 2010, 2011) pero esta concentración inicial puede aumentar durante las operaciones postcosecha posteriores.

1.4.1. Producción de micotoxinas por hongos toxigénicos en granos de cacao

Se ha documentado la presencia de micotoxinas en muestras de grano de cacao fermentado. En los estudios realizados por Gilmour y Lindblom, (2008), Mounjouenpou *et al.* (2008), y Copetti *et al.* (2010) se han detectado la presencia de ocratoxina A (OTA) mientras que en el estudio realizado por Copetti *et al.* (2011) se detectó la presencia de aflatoxinas. Sin embargo, aunque se ha reportado que se pueden producir micotoxinas durante el proceso de fermentación del cacao, empleando mazorcas sanas, la concentración promedio de estas es muy baja (0.02 µg/kg de aflatoxinas y 0.05 µg/kg de OTA) (Copetti *et al.*, 2011, 2012).

1.4.2. Características generales de las micotoxinas

Las micotoxinas son metabolitos secundarios que son producidos principalmente por hongos pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* (Perczak *et al.*, 2018). Cuando estos metabolitos son inhalados, ingeridos o tienen contacto con la piel pueden ser nocivos para los humanos y otros vertebrados. A la respuesta tóxica causada por las micotoxinas en el hombre y los animales se denomina micotoxicosis (Bennett y Klich, 2003).

Las micotoxinas pueden entrar en la cadena alimenticia debido a una infección fúngica en los cultivos, ya sea por consumo humano directo o por su uso como alimento para el ganado. El crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas en los granos puede ocurrir desde el campo o bien durante un almacenamiento prolongado en ambientes con alta temperatura y humedad relativa (Marin *et al.*, 2013). Los hongos producen micotoxinas como respuesta a señales ambientales o bien por factores relacionados con el estrés. Esto conduce a la activación de una cascada transcripcional que se encuentra asociada a la modulación de los genes productores de micotoxinas. Algunos factores como el estrés oxidativo, condiciones de luz, estrés por nutrientes, pH, temperatura y la actividad de agua (a_w) influyen fuertemente en la producción de micotoxinas en muchas especies de hongos diversos géneros de hongos (Reverberi *et al.*, 2010).

A la fecha se han declarado entre 300 a 400 compuestos fúngicos como micotoxinas, sin embargo, solo unos pocos han sido objeto de estudio debido a sus efectos tóxicos en la salud humana y animal (Sadiq *et al.*, 2019). En los sistemas alimentarios generalmente se pueden encontrar seis clases de micotoxinas: aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona, fumosinas y patulina, las cuales pueden observarse en la tabla 1.2.

Tabla 1.2 Principales micotoxinas encontradas en los alimentos

Micotoxina	Principales hongos productores	Alimentos en donde se han encontrado	Principales efectos toxicos
Aflatoxinas (B1, B2, G1 y G2)	<i>A. flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	Cacahuates, maíz, trigo, arroz, sorgo, nueces y especies	Produce daño del DNA, induce cáncer, produce abortos y malformaciones en el feto
Ocratoxinas	<i>A. ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i> , <i>Penicillium verrucosum</i>	Cereales y granos almacenados, frutas, vino y café	Hepatotoxicidad, nefrotoxicidad, inmunotoxicidad y agotamiento de las células linfoides
Tricotecenos (T2: Toxina D2, NIV: Nivalenol, DON: Deoxinivalenol)	<i>F. poae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. graminearum</i>	Maíz, trigo, centeno y otros cereales	Inhibición de síntesis de proteínas, ADN y ARN, cambios neuroendocrinos e inmunosupresión

Micotoxina	Principales hongos productores	Alimentos en donde se han encontrado	Principales efectos toxicos
Zearalenona	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. roseum</i> , <i>F. tricinctum</i>	Maíz, trigo, centeno y sus productos	Abortos espontáneos, cáncer de mamas y cervicouterino en animales, mutagenicidad, aberraciones en los cromosomas y fragmentación del ADN
Fumonisinias (B1, B2 y B3)	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> .	Maíz, sorgo y sus productos, espárragos	Carcinógena, hepatotóxica, causa disrupción de la biosíntesis de esfingolípidos
Patulina	<i>P. expansum</i> , <i>P. cyclopium</i>	Manzanas, peras, jugo de manzana, sidra, forraje	Agitación, convulsiones, edemas, úlceras neurotoxicidad, genotoxicidad e inmunotoxicidad

(Shephard, 2008; Ben Taheur *et al.*, 2019)

La presencia de hongos toxigénicos en los alimentos es un serio problema de salud pública debido a la diversidad de sus efectos tóxicos (carcinógenos, inmunotóxicos, teratogénicos, neurotóxicos, nefrotóxicos y hepatotóxicos), además de que causa pérdidas económicas importantes en el sector agroalimentario.

La ocratoxina A (OTA), que es una micotoxina producida por el metabolismo secundario de muchas especies de hongos filamentosos pertenecientes a los

géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La ocratoxina A es un pentaquetido derivado de la familia de las d dihidrocumarinas. Su nombre químico es: (R)-N-[(5-cloro-3,4-dihidro-8-hidroxi-3-metil-1-oxo-1H-2-benzopirano-7-il)carbonilo]-L-fenilalanina, cuya estructura química se presenta en la Figura 1.8 (el Khoury y Atoui, 2010).

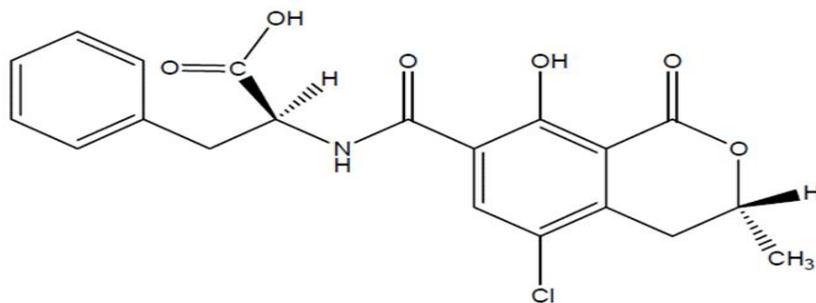


FIGURA 1.8. Estructura química de la ocratoxina A

La OTA es un ácido orgánico débil con un valor de pKa de 7.1 y una masa molar de 403.8 g/mol. Presenta una estructura cristalina que varía de incolora a blanca, esta molécula posee una intensa fluorescencia verde bajo luz UV en medio ácido y fluorescencia azul en condiciones alcalinas. En pH ácido y neutro, la OTA es soluble en disolventes orgánicos polares (alcoholes, cetonas, cloroformo), ligeramente soluble en agua e insoluble en éteres de petróleo e hidrocarburos saturados. El potencial toxicológico de la OTA ha sido evaluado una gran cantidad de veces, siendo objeto de una evaluación completa por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en 1993. En varios estudios se ha demostrado que esta molécula puede tener varios efectos toxicológicos en varias especies animales como nefrotóxico, hepatotóxico, neurotóxico, teratogénico e inmunológico. Incluso se ha relacionado con la incidencia de tumores de riñón e hígado en ratones y ratas, sin embargo, su toxicidad varía según el sexo, la especie y el tipo de animal utilizado en la prueba (el Khoury y Atoui, 2010).

El Comité Conjunto de Expertos sobre Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (Joint Expert Committee on Food Additives) en 1991, estableció el valor de ingesta

semanal tolerable de OTA en 112 ng/kg de peso corporal (16 ng/kg/día). Sin embargo, en 1998, debido a la toxicidad de la OTA, el Comité Científico sobre Alimentos de la Unión Europea (European Union Scientific Committee for Food) determinó que el nivel de seguridad aceptable para la ingesta diaria de OTA debía estar por debajo de 5 ng/kg de peso corporal.

1.4.3. Incidencia de hongos toxigénicos en la cadena productiva del cacao

La infección de granos y cereales por hongos durante el almacenamiento es una seria problemática a nivel mundial. Algunos hongos tienen la capacidad de producir micotoxinas, como ocratoxinas, aflatoxinas fumosinas (Djossou *et al.*, 2011). Según las estadísticas se puede perder hasta entre el 5 y 10% de la producción mundial de alimentos debido al deterioro por hongos. Algunos de los alimentos con más afectados son los granos de café y cacao, ya que durante el almacenamiento de estos productos se pueden contaminar con hongos toxigénicos, lo cual afecta a su calidad e inocuidad teniendo un impacto negativo en su precio. Las micotoxinas más reportadas en el cacao son la ocratoxina A y las aflatoxinas, las cuales pueden producirse durante el tratamiento postcosecha, especialmente durante el secado y el almacenamiento (Copetti *et al.*, 2013). En diversos estudios se ha demostrado que en el cacao, la ocratoxina A se produce principalmente por *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus niger* (Mounjouenpou *et al.*, 2008; Sánchez-Hervás *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2010).

1.5 Principales hongos toxigénicos en la fermentación y en otras etapas de la cadena productiva del cacao

El género de hongos productores de ocratoxinas más relevante en la cadena productiva del cacao es *Aspergillus*. Este género tiene una gran relevancia económica y social, ya que por un lado pueden causar la descomposición de una gran variedad de alimentos pero por otro lado producen una gran cantidad de metabolitos necesarios para la industria farmacéutica y alimentaria como antibióticos, ácidos orgánicos, enzimas, entre otros (Samson *et al.*, 2014). Este género fue descrito por primera vez por Micheli en 1729. El género *Aspergillus* se encuentra dentro del orden *Eurotiales* y pertenece a la familia *Trichocomaceae*.

En la clasificación de los hongos filamentosos, su tipo de reproducción es un factor relevante, por lo que tradicionalmente al género *Aspergillus* se le incluía dentro de los Deuromicetos u “hongos imperfectos”, ya que se clasificaban en base a su morfología asexual, aunque se conociera su forma telemórfica o sexual (Carlile *et al.*, 2001). Sin embargo, para el caso del género *Aspergillus*, aproximadamente un tercio de las especies descritas poseen forma sexual conocida (Geiser, 2009). Los principales géneros en los que son clasificados las formas teleomórficas de *Aspergillus* son *Eurotium* y *Emericella*. Sin embargo, la sección *Circumdati*, a la que pertenece *Aspergillus ochraceus*, tiene el género teleomorfo *Neopetromyces* (Frisvad y Samson, 2000) mientras que la sección *Flavi* (*Aspergillus flavus*) se clasifica con los miembros del género *Petromyces* (Subramanian, 1972).

Los primeros trabajos para clasificar a los *Aspergillus* solo consideraban sus características morfológicas micro- y macroscópicas, como la morfología colonial, pigmentación, tamaño y forma de las cabezas conidiales, entre otras características. Gracias a la construcción de filogenias bioquímicas y moleculares el número de especies de *Aspergillus* identificadas ha aumentado aproximadamente 250 especies (Geiser *et al.*, 2007).

Algunas especies de hongos que pertenecen a la sección *Nigri* han mostrado tener la capacidad de producir ocratoxina A. Estas especies son *Aspergillus niger*, *A. carbonarius*, *A. lacticoffeatus*, *A. sclerotioniger* y *A. tubingensis*. De todas estas especies, *A. carbonarius* muestra el mayor potencial ocratoxigénico tanto en el porcentaje de especies productoras como en la concentración de ocratoxina producida (Serra *et al.*, 2006; Samson *et al.*, 2007). La producción de ocratoxina A por miembros de esta sección se observa en uvas y productos derivados, café y cacao (Serra *et al.*, 2006; Noonim *et al.*, 2008; Copetti *et al.*, 2012).

Por otro lado, la sección *Flavi*, también ha sido ampliamente estudiada ya que contiene dos especies con una gran importancia económica, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* (Rokas *et al.*, 2007). Morfológicamente, *A. flavus* es descrito como un hongo aterciopelado de color amarillo a verde, y que posee un reviro dorado o rojo marrón (Hedayati *et al.*, 2007). *Aspergillus flavus* es productor de

aflatoxinas y ha sido descrito como la segunda causa de aspergilosis en pacientes con el sistema inmune comprometido (Hedayati *et al.*, 2007; Rokas *et al.*, 2007).

1.6 Uso de las BAL como alternativa para biocontrol de los hongos en la cadena productiva del cacao

En los últimos años se han buscado estrategias para disminuir el crecimiento de hongos, principalmente los productores de micotoxinas, durante el almacenamiento de granos y cereales. Tradicionalmente, se empleaban aditivos químicos y antibióticos, sin embargo, la mayoría de los hongos han generado resistencia a estas sustancias.

En los últimos años se ha evidenciado que las bacterias ácido-lácticas tienen la capacidad de producir compuestos que inhiben el crecimiento de hongos en diversos alimentos, principalmente cereales y granos. Estas cepas de BAL son aisladas de diversas fuentes y se ha mostrado su efectividad en algunas matrices alimentarias, en el 2019 se demostró que cepas BAL aisladas de fermentaciones de cacao mostraron tener capacidad de inhibir el crecimiento de cepas de *Aspergillus*, *Penicillium* y *Gibberella* (Romanens *et al.*, 2019; Ruggirello *et al.*, 2019). Sin embargo, la diversidad microbiana es dependiente de la ubicación donde se lleva a cabo el proceso postcosecha, por esta razón, es necesario realizar estudios acerca del potencial antifúngico que pueden presentar las cepas de bacterias ácido-lácticas autóctonas del proceso de fermentación de cacao en México contra cepas de hongos toxigénicos como *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*, que se han encontrado a lo largo de las etapas postcosecha del cacao en México.

2. OBJETIVOS

2.1 General

Aislar, caracterizar y evaluar la capacidad de generación de compuestos antifúngicos obtenidos por las bacterias ácido-lácticas aisladas del grano de cacao.

2.2 Específicos

- Aislar y caracterizar morfológica y bioquímicamente las cepas de BAL aisladas del proceso de fermentación del cacao.
- Evaluar el potencial antifúngico de las BAL y determinar la naturaleza química de estos compuestos producidos.
- Determinar la potencialidad *in vivo* de las BAL seleccionadas empleando granos de cacao fermentado inoculado con tres cepas de hongos toxigénicos.

3. HIPÓTESIS

Algunas de las bacterias ácido-lácticas autóctonas del proceso de fermentación del cacao en México tendrán un efecto antifúngico contra algunos de los hongos toxigénicos encontrados durante el secado y almacenamiento de los granos de cacao como *Aspergillus ochraceus*, *A. niger* y *A. flavus*, y por lo tanto podrían ser utilizadas en el biocontrol en la cadena productiva del cacao

4. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La infección de alimentos por hongos durante el almacenamiento es causante de grandes pérdidas a nivel mundial. Gran parte de esta problemática radica en la capacidad que presentan algunos hongos de producir micotoxinas, principalmente aflatoxinas, ocratoxinas y fumosinas. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), estimó que las pérdidas de cultivos contaminados con micotoxinas eran del 25%.

El cacao es susceptible al ataque de hongos a lo largo de su cadena productiva, principalmente durante el secado y secado, afectando su calidad e inocuidad debido a la producción de micotoxinas; esto tiene un impacto negativo en el precio y aprovechamiento. Una de las alternativas más viables para disminuir esta problemática es el uso de la bacterias ácido-lácticas como agentes antifúngicos (bio-control). En diversos estudios se ha demostrado la gran potencialidad que tienen las bacterias ácido- lácticas para producir compuestos con actividad antifúngica que pueden ser posteriormente utilizados para inhibir el crecimiento de hongos durante el almacenamiento de granos, cereales y otros alimentos.

5. MATERIALES Y METODOS

5.1. Material Biológico

5.1.1 Granos de cacao fermentados

Las muestras de grano de cacao utilizadas para el aislamiento de bacterias ácido-lácticas autóctonas del proceso de fermentación fueron proporcionadas por la empresa Agroindustriales Serranas S.A de C.V., ubicada en Comalcalco, Tabasco durante la cosecha 2018. El muestreo fue realizado en condiciones asépticas (Figura 5.1). El cacao utilizado para la realización de las fermentaciones fue variedad Criollo. Para la realización de las fermentaciones, las mazorcas de cacao fueron cortadas utilizando un machete, posteriormente la pulpa y los granos de cacao fueron pesados y se distribuyeron de forma equitativa en tres cajas de fermentación (Figura 5.2). Cada caja de fermentación tenía 30 kg de pulpa y grano de cacao. Se tomaron muestras de 500 g cada una de las fermentaciones cada 24 horas durante 96 horas, de las cuales se tomó una muestra de 20 g para realizar el aislamiento de las BAL en condiciones estériles, mientras la muestra restante se almacenó en congelación a una temperatura de -20°C hasta su análisis.



FIGURA 5.1. Mazorcas de cacao



FIGURA 5.2. Cajas de fermentación

5.1.2 Cepas productora de Ocratoxina A

Se utilizaron tres cepas productoras de OTA, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus ochraceus*, autóctonas del grano de cacao, codificados como ASP 1, ASP 2 y ASP 3, respectivamente. Estas cepas fúngicas fueron aisladas previamente por Hernández-Medina (2018) durante su tesis de maestría realizada en el Laboratorio de Bromatología perteneciente a la Unidad de Investigación en Alimentos en el laboratorio de Bromatología (Figura 5.3).

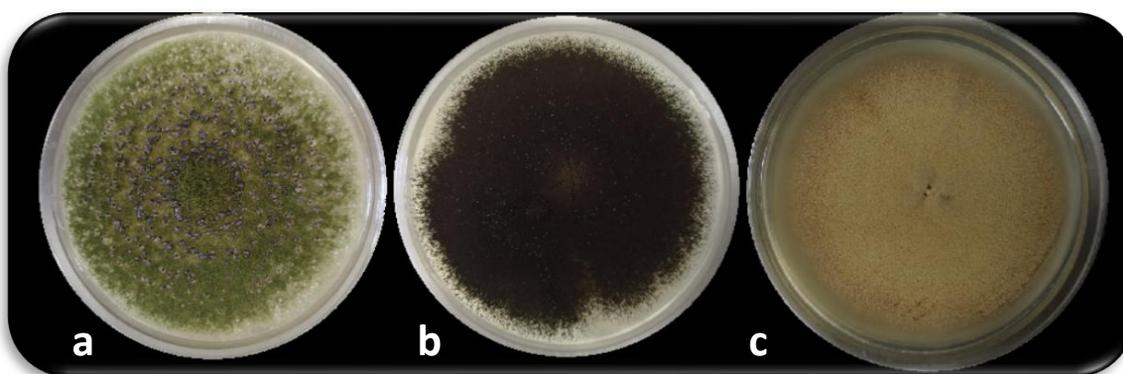


FIGURA 5.3. Cepas de Hongos (a). *Aspergillus flavus*, b). *Aspergillus carbonarius* y c) *Aspergillus ochraceus*

5.1.3 Cepas de Bacterias Lácticas

Las cepas de BAL empleadas para el estudio de la capacidad productora de compuestos antifúngicos fueron aisladas de muestras obtenidas del proceso de fermentación del grano de cacao proveniente de dos cosechas del 2018, una realizada en los meses de febrero y octubre. Las fermentaciones fueron realizadas en las instalaciones en Agroindustriales Serranas S.A. de C.V. ubicada en Comalcalco, Tabasco. A partir de estas fermentaciones, se han aislado cepas de BAL que presuntivamente se han identificado por caracterización fenotípica como *Lactobacillus plantarum* (BAL 1, BAL 3, BAL 4, BAL 7 y BAL 9), *Lactobacillus fermentum* (BAL 2), *Lactobacillus brevis* (BAL 5 y BAL 6) y *Leuconostoc mesenteroides ssp cremoris* (BAL 8).

5.2 Metodología general

La metodología general que se utilizó para la realización de este proyecto se observa en la Figura 5.4:

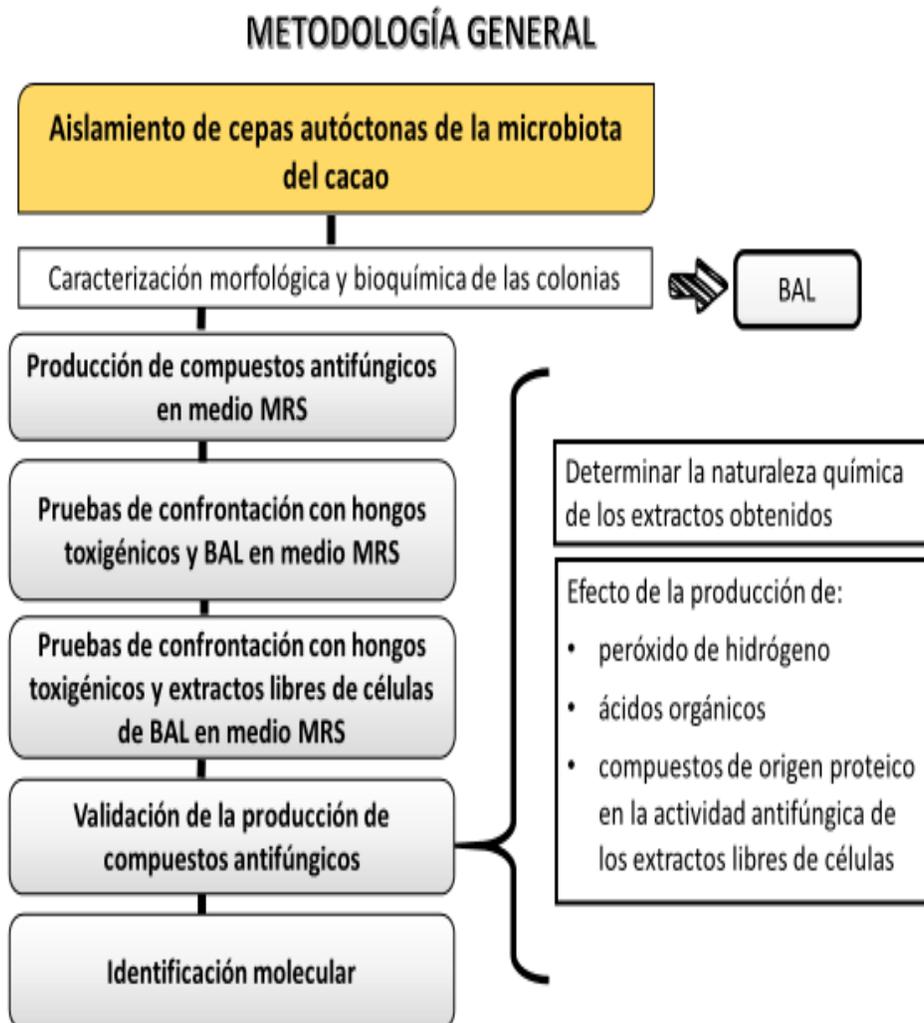


FIGURA 5.4. Esquema general de la metodología del proyecto

5.2.1 Muestreo

El muestreo del grano de cacao se realizó durante la fermentación, cada 24 horas durante cuatro días bajo condiciones asépticas y uso de guantes estériles cubre bocas y bolsas esterilizadas (Figura 5.5). Para cada una de las cajas de fermentación se realizó un muestreo en distintos puntos y profundidades (cinco puntos en forma de domino, cuatro en las esquinas y una en el centro en el fondo, en medio y sobre la superficie), con el objetivo de tener una muestra representativa de 500 g por cada caja de fermentación. Durante la fermentación también se realizó el monitoreo de temperatura y pH. A partir de estas muestras se llevo a cabo el aislamiento de bacterias ácido-lácticas autóctonas del proceso.



FIGURA 5.5. Toma de muestra de grano de cacao fermentado de las cajas de fermentación estáticas

5.2.2 Aislamiento de bacterias ácido lácticas (BAL) de los granos de cacao

El aislamiento de BAL autóctonas del proceso de fermentación del cacao se realizó siguiendo la metodología reportada por Pereira *et al.* (2012). Se tomaron 20 g de cada muestra los cuales se adicionaron en condiciones estériles a un matraz Erlenmeyer que contenía 180 mL de una solución salina a 0.85%, estéril. Esta solución (dilución 10^1) fue agitada durante 10 minutos. A partir de ésta se realizaron diluciones decimales hasta 10^5 . Las diluciones 10^3 , 10^4 y 10^5 fueron inoculadas en cajas Petri con medio MRS (Man Rogosa Sharpe) adicionado con 50 μ L de ciclohexamida por Litro de medio. Cada dilución se realizó por duplicado. Posteriormente, las cajas Petri inoculadas fueron incubadas a 30°C durante 48

horas en condiciones de anaerobiosis en una incubadora (Felisa Fe-293, México) para favorecer el crecimiento de las BAL. Al término del periodo de incubación, se observaron las colonias presentes en cada una de las cajas y se seleccionaron las que presentaban características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) diferentes. Cada una de las colonias seleccionadas fue resembrada en agar MRS por la técnica de la estría cruzada, lograr el aislamiento de cada una de las bacterias con morfología colonial diferente. Las cajas inoculadas por estría cruzada fueron incubadas a 30°C durante 48 horas en anaerobiosis. A cada una de las cepas aisladas se les realizó tinción de Gram, prueba de catalasa, oxidasa de asimilación de carbohidratos; así como pruebas de crecimiento a diferentes condiciones de pH y temperatura, para la determinación presuntiva de BAL.

5.3. Caracterización morfológica y bioquímica de las BAL aisladas de la fermentación de cacao

Se realizó la caracterización morfológica (a nivel microscópico y colonial) y bioquímica de las bacterias que fueron aisladas. Las cepas que no cumplieron con los criterios morfológicos y bioquímicos de las BAL fueron descartadas. La caracterización morfológica y bioquímica realizada a las BAL aisladas de la fermentación se realizó siguiendo la metodología mostrada en la Figura 5.6. Estas pruebas son las más representativas para la caracterización morfológica y bioquímica de las BAL (Cowan *et al.*, 1993; Boone *et al.*, 2001; Holzapfel y Wood, 2014).

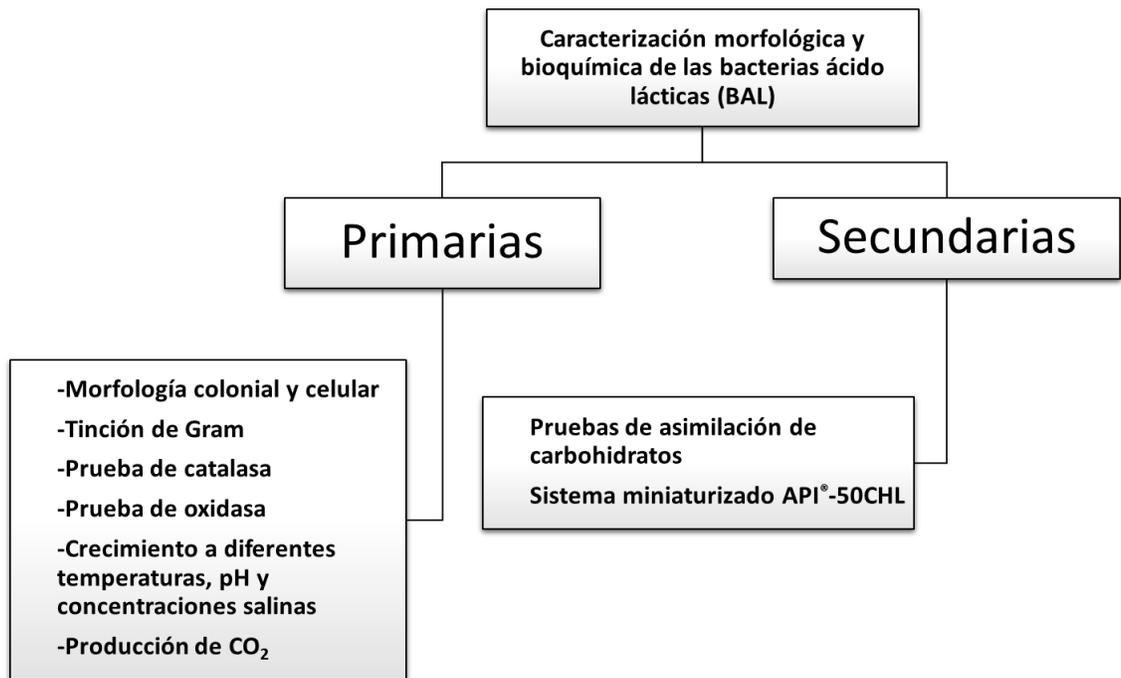


FIGURA 5.6. Esquema general de la etapa de caracterización morfológica y bioquímica de las bacterias ácido-lácticas

5.3.1 Tinción de Gram

Se realizó la tinción de Gram para cada una de las bacterias aisladas del grano de cacao, siguiendo el protocolo establecido propuesto por Bisen (2014). La metodología realizada se muestra en el apéndice 10.1 empleando el microscopio de campo claro (Motic BA200. U.S.A.) utilizando el objetivo de inmersión (100x).

5.3.2 Prueba de catalasa

Para esta prueba se utilizó la técnica propuesta por Reiner (2010), la cual se describe brevemente en el apéndice 10.1.

5.3.3 Prueba de oxidasa

Para la realización de esta prueba se utilizó la tira Bactiden Oxidasa® (Merck) mediante la metodología descrita en el apéndice 10.1 Con el asa de inoculación se tomó una asada de una colonia, la cual fue aplicada sobre la zona reactiva de la tira Bactiden Oxidasa ® (Merck) y se frotó con el asa de inoculación. Al cabo de 60 segundos se comparó la tira reactiva con la escala colorimétrica de la prueba.

5.3.4 Pruebas de crecimiento a diferentes condiciones de pH

Para llevar a cabo estas pruebas, primeramente, se realizó la activación de las BAL, en caldo MRS por 24 horas a 30°C. De este cultivo se tomó un mL, el cual fue ajustado con la escala de Mc Farland, para inocular cada uno de los tubos de rosca que contenían 9 mL caldo MRS estéril con el pH modificado (2, 4, 6 y 8). El ajuste de pH del caldo MRS fue realizado con la adición de HCl (2N) o NaOH (2N). Todos los tubos de prueba fueron incubados a 30°C durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por duplicado. Se realizó la cuantificación de la absorbancia a 600 nm utilizando como blanco el medio MRS sin inocular en un espectrofotómetro (VELAB modelo VE-5600UVPC, Mexico) de cuatro celdas con rango de longitud de onda de 190 – 1100 nm un ancho de banda de 2 nm.

5.3.5 Pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas

Para la realización de estas pruebas también se realizó el acondicionamiento de las BAL en caldo MRS por 24 horas a una temperatura de 30°C. De este cultivo se tomó un mL, el cual fue ajustado con la escala de Mc Farland, para inocular cada uno de los tubos de rosca que contenían 9 mL de caldo MRS estéril. Una vez inoculados los tubos fueron incubados (Felisa Fe-293, México) a diferentes temperaturas comprendidas 4 y 45°C. Las pruebas se realizaron por duplicado. El crecimiento microbiano fue observado midiendo la absorbancia a 600 nm utilizando como blanco el medio MRS sin crecimiento.

5.3.6 Pruebas de crecimiento a diferentes condiciones salinas

Para la realización de estas pruebas se realizó el acondicionamiento de las BAL en caldo MRS por 24 horas a una temperatura de 30°C. De este cultivo se tomó un mL, el cual fue ajustado con la escala de Mc Farland, para inocular cada uno de los tubos de rosca que contenían 9 mL de caldo MRS estéril adicionado con tres diferentes concentraciones de NaCl (2, 4 y 6.5 %). Todos los tubos de prueba fueron incubados a 30°C durante 24 horas. Las pruebas se realizaron por duplicado. El crecimiento microbiano se observó midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (VELAB modelo VE-5600UVPC, México) utilizando como blanco el medio MRS sin crecimiento.

5.3.7 Pruebas de producción de dióxido de carbono (CO₂)

Para la realización de las pruebas de producción de dióxido de carbono (CO₂) se utilizó la metodología propuesta por Bisen (2014), la cual se describe en el apéndice 10.1.

5.3.8 Codificación y almacenamiento de las cepas de BAL

Las bacterias aisladas que presentaron características de bacterias ácido-lácticas, tinción Gram +, morfología colonial y microscópica, catalasa y oxidasa negativas fueron codificadas y almacenadas en un tubo inclinado. También se realizó el almacenamiento en congelación de las cepas de BAL aisladas del cacao en caldo MRS con 50% de glicerol. Algunas de las cepas aisladas se muestran en la Figura 5.7.

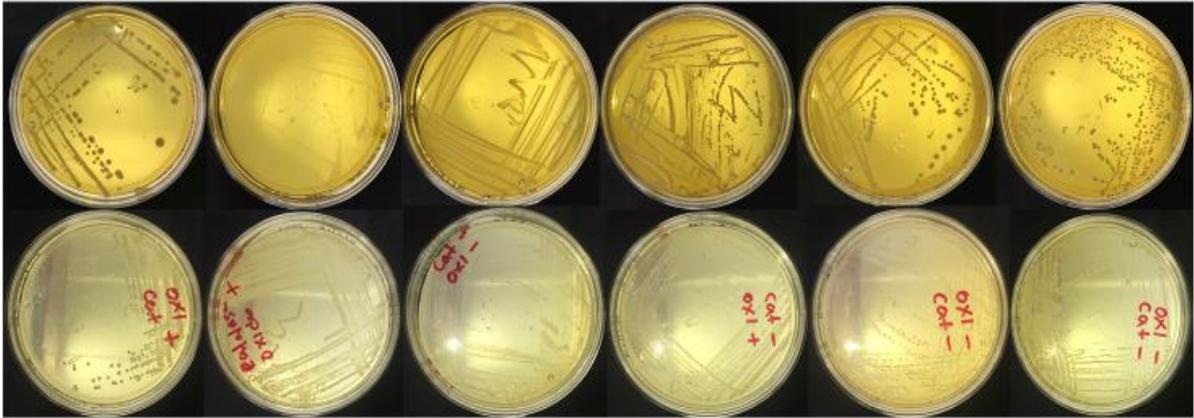


FIGURA 5.7 Cepas aisladas de la fermentación del grano de caja en agar MRS

5.3.9 Pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos

Las pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos de las cepas aisladas se realizaron con el sistema miniaturizado API®-50CHL para las cepas que presentaron una morfología microscópica (presuntivamente *Lactobacillus*). Estas pruebas permiten la identificación presuntiva a nivel especie. Esta prueba se realizó a las cepas bacterianas que presentaron las características morfológicas (macroscópicas y microscópicas) de BAL, así como las pruebas de catalasa y oxidasa negativas. Esta prueba permitió la identificación presuntiva de las bacterias ácido-lácticas aisladas empleando el patrón de asimilación y/o fermentación de carbohidratos (Figura 5.8), los resultados fueron analizados usando el software en línea APIWEB™ (Ver Apéndice 1).



FIGURA 5.8. Galerías API 50CHL de Biomérieux

5.4 Pruebas de confrontación de las bacterias ácido-lácticas con los hongos toxigénicos

Las cepas aisladas y previamente acondicionadas de BAL fueron inoculadas a caldo MRS e incubadas a 30°C para poder realizar las pruebas de confrontación contra tres cepas de hongos toxigénicos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*. Estas pruebas de confrontación fueron realizadas utilizando todo el extracto incluyendo las células de las BAL y con los extractos libres de células para observar el efecto de estos sobre el crecimiento de los hongos toxigénicos. Para la obtención de los extractos libres de células de BAL, se centrifugó el cultivo de cada una de las BAL a 4390 x g por 10 minutos en una centrifuga (Eppendorf 5810R, Alemania) con capacidad para 6 tubos falcón y con velocidad de centrifugación de hasta 20,913 x g (14,000 rpm). y posteriormente fueron filtrados por una membrana de 0.45 µm (Cortés-Zavaleta *et al.*, 2014).

5.4.1 Preparación de inóculos de hongos para pruebas de confrontación

La preparación de los inóculos de esporas de los hongos fue realizada a partir de una suspensión de conidios obtenida a partir de un cultivo de siete días del hongo cultivado en PDA acidificado a 35°C siguiendo la metodología propuesta por Suárez-Quiroz *et al.* (2013). Para esto se realizó un raspado con el asa bacteriológica sobre las esporas, posteriormente se adicionaron 10 mL de Tween

80 al 0.05%. Se tomó 1 mL de esta suspensión el cual fue suspendido en nueve mL de Tween 80 al 0.05% contenidos en un tubo estéril. A partir de esta suspensión se realizaron diluciones seriadas hasta lograr obtener la solución de trabajo de cada uno de los hongos a una concentración aproximada de $(1 \times 10^6$ esporas/mL), la cuantificación se realizó mediante conteo al microscopio usando una cámara de Neubauer. El procedimiento se puede observar en la Figura 5.9.

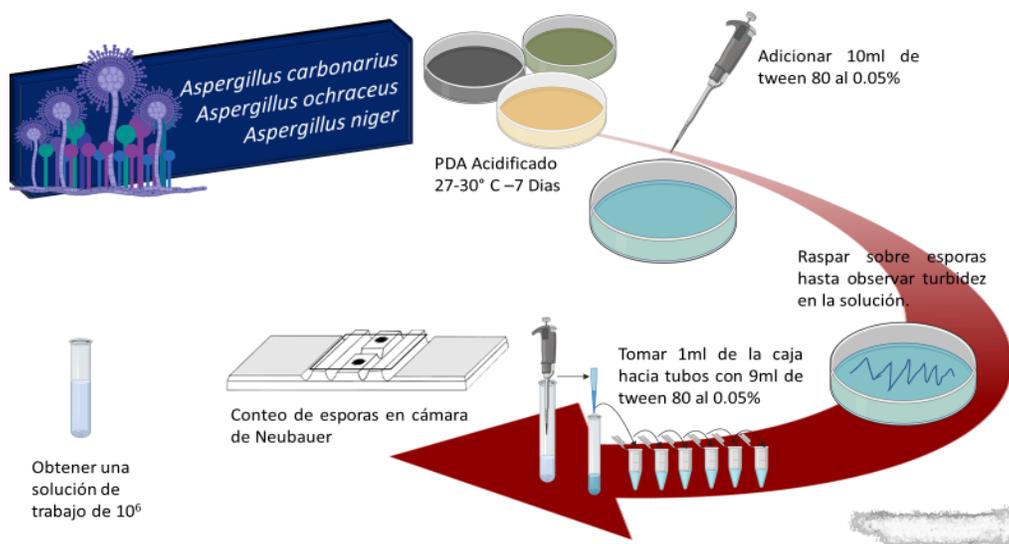


FIGURA 5.9. Metodología empleada para la preparación de inóculos de hongos

5.4.2 Preparación de inóculos de BAL para las pruebas de confrontación

Para la obtención de los inóculos de las bacterias ácido-lácticas (BAL) se llevó a cabo la estandarización de la concentración bacteriana para las pruebas de confrontación con los tres hongos toxigénicos. Para llevar a cabo esta estandarización aproximada entre 10^6 - 10^7 UFC/mL se realizaron pruebas de crecimiento bacteriano en caldo MRS empleando una temperatura de incubación de 30°C. Se midió el crecimiento microbiano por conteo en placa con la técnica de micro diluciones propuesta por Miles *et al.* (1938) y por absorbancia a 600 nm a diferentes tiempos varios tiempos (10h, 12h, 18h y 24h).

5.4.3 Pruebas de confrontación de los cultivos celulares de BAL o extractos libres de células sobre la germinación de hongos toxigénicos

Se realizaron las pruebas de confrontación de los cultivos celulares de las BAL o bien de los extractos libres de células de cada una de las cepas de BAL aisladas del cacao. Para las pruebas de confrontación con los cultivos celulares de las BAL se utilizaron 25 mL de caldo MRS estéril, el cual inoculados con 500 μ L (ajustados con la escala de Mc Farland) de un cultivo de BAL realizado previamente. Este cultivo fue incubado a 30° C durante 16 h, que es el tiempo en el que se alcanzó una concentración celular entre 10^6 - 10^7 UFC/mL. Para la obtención del extracto libre de células, el cultivo de 24 horas de cada una de las cepas de BAL estudiadas fue centrifugado (Eppendorf 5810R, Alemania) a 4390 x g durante 15 min a 7°C Al término de la centrifugación se tomó el sobrenadante para la realización de las pruebas de confrontación. Para la realización de las pruebas de confrontación ya sea utilizando los cultivos celulares o los extractos libres de células fue realizado de la siguiente manera, se colocaron 100 μ L de la suspensión de esporas del hongo a probar en microtubos de tapón de rosca de 2mL (Biologix), posteriormente se adicionó 100 μ L del cultivo celular y/o el extracto libre de células. Finalmente, a cada uno de los tubos se le añadió 800 μ L de caldo MRS estéril, cuidando de no cerrar completamente el taparroca. Los tubos fueron incubados a 30°C durante 72 horas. Se prepararon tubos con 100 μ L de cada extracto celular y/o extracto libre de células con 900 μ L de caldo MRS estéril como testigo positivo y tubos con 100 μ L del inóculo de cada hongo a probar y 900 μ L de caldo MRS estéril. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. La evolución del desarrollo del hongo se observó a las 24 y 72h al microscopio. y se realizaron por triplicado. La metodología utilizada para la realización de las pruebas de confrontación puede observarse en la figura 5.10.

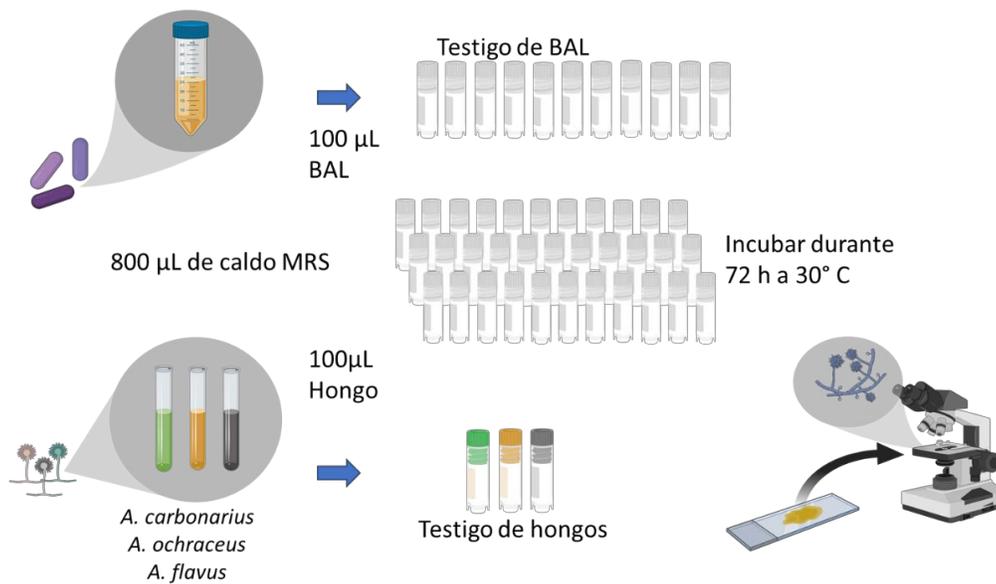


FIGURA 5.10. Metodología para las pruebas de confrontación de las BAL aisladas del cacao sobre la germinación de los hongos toxigénicos

5.4.4 Determinación de la actividad antifúngica de los extractos libres de células

Se evaluó la actividad antifúngica de los extractos libres de células de cada una de las cepas de BAL aisladas del cacao mediante la técnica propuesta de Ruggirello *et al.* (2019) con algunas modificaciones. Para esta técnica se emplearon microplacas con 96 pocillos para poder evaluar diferentes concentraciones (10 al 100%) de los extractos libres de células de cada una de las BAL sobre la germinación de los hongos del género *Aspergillus* empleados en este estudio. En la Figura 5.12, se puede observar el diseño de la prueba para la determinación de la actividad antifúngica del extracto libre de células.

Primeramente, se colocaron 150µL caldo MRS estéril como control negativo en cada uno de los pocillos de la primera columna de la microplaca. A partir de la segunda columna hasta la penúltima se colocaron los extractos libres de células de cada una de las BAL probadas. En cada una de estas filas se les agregó diferentes volúmenes del extracto libre de células (10µL, 40µL, 50µL, 60µL, 80µL, 90µL

y, 100µL). Posteriormente, se adicionó a cada uno de los pocillos 10µL de inóculo del hongo a estudiar con una concentración de esporas de 10⁴ esporas/mL (aproximadamente siete días de crecimiento). Finalmente se ajusta el volumen de cada pocillo a 150µL. En la última columna solo se adicionó en cada pocillo 10µL del inóculo de hongo y 140µL de caldo MRS como control positivo del crecimiento del hongo, ver Figura 5.11.

Las microplacas fueron incubadas a 30° C por 72h. Al término de la incubación se leyó la absorbancia de las microplacas a 490 nm. El cálculo de la actividad antifúngica fue calculado mediante la siguiente ecuación 1.

$$\text{Actividad Antifúngica (\%)} = \frac{\text{Abs(hongo)} - \text{Abs(extracto+hongo)}}{\text{Abs(hongo)} - \text{Abs(testigo)}} \times 100 \quad \text{Eq. 1}$$

donde:

Abs (hongo) = Absorbancia de los pocillos donde hubo un crecimiento total del hongo

Abs (extracto + hongo) = Absorbancia de los pocillos en donde fue la confrontación del extracto con el hongo

Abs (MRS) = Absorbancia de los pocillos con caldo MRS estéril

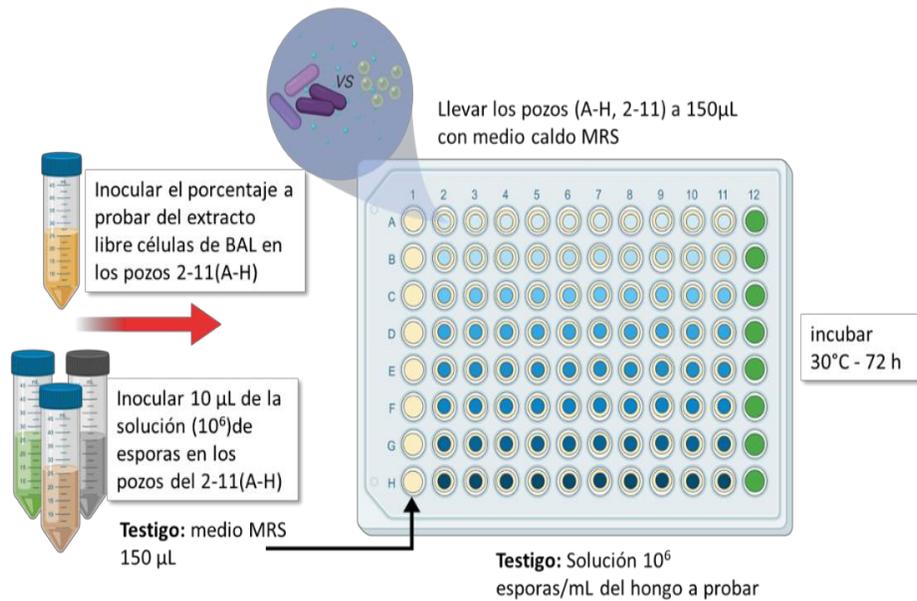


FIGURA 5.11. Diseño de la prueba para la determinación de la actividad antifúngica del extracto libre de células

5.5 Determinación de la naturaleza química de los extractos libres de células

Para determinar la naturaleza química de los extractos libres de células de las BAL se realizó la siguiente metodología. Primeramente se eliminó el efecto de la producción de ácidos orgánicos ajustando el pH del extracto libre de células a un valor de 7 (Sezer y Güven, 2009). Posteriormente se determinó la actividad antifúngica del extracto eliminando el efecto de la producción de ácidos orgánicos mediante la prueba de confrontación en tubo siguiendo la metodología indicada en la sección 5.5.3.

Posteriormente para eliminar el efecto de la producción de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por la BAL se utilizó el extracto de libre de células de cada una de las BAL con el pH ajustado. A los extractos libres de células con el pH ajustado a 7 se les adicionó una solución de catalasa a una concentración de 0.1 mg/mL, esta mezcla fue incubada a una temperatura de 25°C durante 90 minutos. La reacción

se detuvo por calentamiento a 60°C por 10 minutos (Sezer y Güven, 2009). Posteriormente se determinó la actividad antifúngica del extracto eliminando el efecto combinado de la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno siguiendo la metodología indicada en la sección 5.5.3.

Finalmente, para eliminar el efecto de la producción de compuestos de naturaleza proteica se realizó una hidrólisis con proteinasa K (0.1 mg/mL) de cada uno de los extractos libres de células con pH ajustado a 7 y tratados con catalasa. La reacción de hidrólisis se realizó por 120 minutos a 37°C. Al término de está, la reacción fue detenida por calentamiento a 60°C durante 10 minutos (Mobarez *et al.*, 2008). La actividad antifúngica del extracto sin el efecto de la producción de orgánicos, peróxido de hidrógeno y compuestos proteicos fue realizada por la técnica antes mencionada (5.5.3).

5.6 Cuantificación de los principales compuestos con actividad antifúngica presentes en los extractos libres de células de la BAL con mayor potencial

5.6.1 Determinación de ácidos orgánicos por cromatografía de líquidos (HPLC)

Para la cuantificación del ácido fenil-láctico se utilizó la técnica propuesta por Armaforte *et al.* 2006 con modificaciones. Las cepas de BAL fueron crecidas en caldo MRS durante 24 horas a 30°C. Al final de la incubación, las muestras se centrifugaron a 4390 x g durante 15 minutos para la obtención de los extractos libres de células los cuales posteriormente fueron filtrados por un filtro de 0.22 µm. Estas muestras fueron inyectadas en el HPLC (Shimadzu, Japón) utilizando una columna C₁₈ a temperatura ambiente, con flujo de 1mL/min, la fase móvil fue de agua-acetonitrilo (50-50%), utilizando un detector UV a una λ de 210 nm y un tiempo de corrida de 15 min.

Para el caso de los ácidos orgánicos (láctico, succínico y acético) se utilizó el protocolo adaptado de Guimarães *et al.* (2018a), en el cual primeramente, se obtuvieron 10mL de extracto libre de células como se describió anteriormente. A

estos extractos se les añadió 10mL de acetato de etilo mezclado con ácido fórmico al 1%, 4 g de MgSO₄ y 1 g de NaCl. La mezcla fue agitada en el vórtex (Genie 2, E.U.A.) durante 1 minuto y posteriormente fue centrifugada durante 10 minutos a 4390 x g, recogiendo la fracción de disolvente orgánico. Posteriormente a 5 mL de esa fracción se añadieron 100 µl de DMSO. La solución resultante se secó bajo nitrógeno, se reconstituyó a 1 mL con H₂O: acetonitrilo (90:10, v/v), para posteriormente ser filtrada con un filtro de 0.45 µm, las muestras filtradas fueron colocadas en viales ámbar para HPLC. Las muestras fueron analizadas por HPLC (Shimadzu, Japan), empleando un detector de UV ($\lambda=210$ nm) y una columna Aminex HPX-87H utilizando un flujo de 0.6 mL/min de agua con 5mM de ácido sulfúrico a 50°C y detector UV a 210 nm.

Para la construcción de las curvas patrón se utilizaron estándares de ácido láctico (98%), ácido succínico (99%), ácido acético (99.7%) y ácido 3-fenilláctico (98%), todos de la marca Sigma a las concentraciones de 10, 50, 300 y 500ppm.

5.6.2 Determinación de peróxido de hidrógeno

Para la determinación de la producción de peróxido de hidrógeno por las BAL, se empleó un kit comercial HANA Instrument. Esta determinación volumétrica se basa en la reacción de una solución ácida con el yoduro. Esta reacción requiere de 15 minutos para completarse. La cantidad de yodo que se genera es equivalente al peróxido de hidrógeno que se encuentra en la muestra el cual es titulada con una solución estándar de tiosulfato de sodio que reduce el yodo nuevamente a iones de yoduro.

5.6.3 Determinación de compuestos de naturaleza proteica por cromatografía de líquidos (HPLC)

Para el análisis de los compuestos de naturaleza proteica se utilizó la técnica cromatográfica propuesta por Rojas-Ronquillo *et al.* (2012) en la cual las muestras filtradas a través de un filtro de 0.45 µm serán determinadas por HPLC (Shimadzu,

Japón) empleando una columna C₁₈ en fase reversa. Las muestras fueron eluidas utilizando un gradiente lineal de 100 al 30% en minutos del solvente A (0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua) en el solvente B (9:1 de TFA en acetonitrilo (0.1%) y TFA en agua (0.1%)) a un flujo de 1mL/min. La elución fue monitoreada a una $\lambda = 254$ nm.

5.7 Prueba de validación *in vivo* del efecto antifúngico utilizando granos de cacao

Se evaluó el efecto antifúngico de las cepas que presentaron una mayor actividad antifúngica utilizando granos de cacao fermentado, siguiendo la metodología propuesta por Romanens *et al.* (2019). Para la realización de esta prueba se utilizaron 20g de granos de cacao fermentado, los cuales fueron pesados y colocados en matraces Erlenmeyer para su esterilización. Se realizó la preparación del inóculo de hongos siguiendo la metodología indicada en la sección 5.5.1 hasta tener la concentración de 1×10^6 esporas/mL, también se realizó la preparación del inóculo de las BAL siguiendo la metodología propuesta en la sección 5.5.2 hasta la concentración de 1×10^6 UFC/mL. Se colocó 10 mL de caldo MRS estéril a los matraces Erlenmeyer con los granos de cacao y posteriormente se le agregaron 100 μ L de inóculo de esporas del hongo y un mL del inóculo de las cepas de BAL. Se drenó el exceso del inóculo y los granos de cacao fueron colocados en cajas de Petri estériles. Las cajas fueron incubadas a 30°C durante 72 horas, utilizando una caja Petri con granos de cacao fermentados estériles sin inocular. También se comparó con granos de cacao inoculados solamente con las tres cepas de hongos utilizadas en este estudio *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus* respectivamente. Se observó el desarrollo del hongo a las 24, 48 y 72 horas. El procedimiento realizado se observa en la figura 5.12.

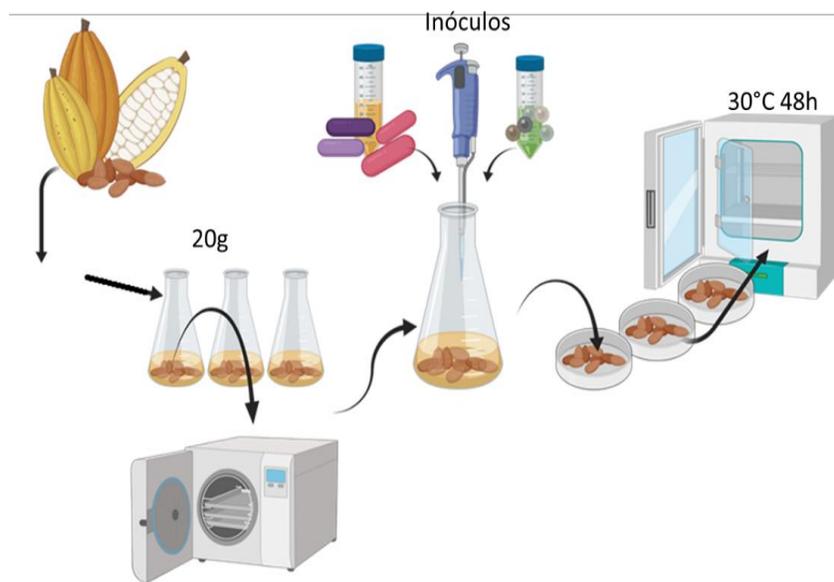


FIGURA 5.12. Validación *in vivo* de la producción de compuestos antifúngicos empleando granos de cacao fermentado

5.8 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis multivariado de varianza (MANOVA) para la actividad antifúngica y para la concentración de los ácidos orgánicos (láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico). Las diferencias entre los grupos se determinaron por el medio de la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer ($\alpha=0,05$) utilizando el software estadístico NCSS 11 (NCSS, LLC, Kaysville, Utah, U.S.A.).

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Seguimiento de temperatura y pH durante la fermentación en caja estática de los granos de cacao

La temperatura y el pH durante la fermentación del cacao son dos parámetros importantes para poder evaluar el proceso fermentativo (Sandhya *et al.*, 2016), por lo tanto deben de observarse durante el mismo. Esto se debe a que durante la fermentación del cacao la actividad microbiana del microbiota nativa produce cambios significativos en estos parámetros, por lo cual pueden ser fácilmente detectados. En la Figura 6.1 se muestra la temperatura promedio de las fermentaciones realizadas durante la cosecha 2018-2. Se puede observar que, al inicio de las fermentaciones, la temperatura de la masa fermentativa era de 34°C, la cual fue aumentando hasta alcanzar su máximo de 45°C durante el segundo día de fermentación. Esta temperatura se conservó durante 24 horas más para disminuir hasta los 37°C a las 92 horas de fermentación. Sandhya *et al.* (2016) reportaron que durante la etapa de crecimiento de las levaduras y BAL, que se lleva a cabo durante las primeras 48 horas de fermentación espontánea del grano de cacao, se pueden alcanzar temperaturas de hasta de 38°C, posteriormente encontraron que la temperatura en la masa fermentativa se incrementó hasta los 41 °C como consecuencia del crecimiento de las bacterias ácido-acéticas (BA). Este comportamiento en las temperaturas fue similar al observado en este trabajo.

El incremento en la temperatura de la masa de fermentación durante este proceso es causada por la oxidación del alcohol, que es un proceso exotérmico, lo cual provoca la elevación de la temperatura de la masa fermentativa, llegándose a alcanzar temperaturas superiores a los 45° C (De Vuyst y Weckx, 2016; Gutiérrez, 2017). Algunos investigadores incluso han llegado a reportar temperaturas de la masa fermentativa que superan los 50°C durante fermentaciones realizadas con

más de 100 kg (Lagunes-Gálvez *et al.*, 2007; Hernández-Hernández *et al.*, 2016; Papalexandratou *et al.*, 2019), mientras que para el caso de fermentaciones realizadas a pequeña escala se han reportado temperaturas cercanas a los 45°C (Pereira *et al.*, 2012; Sandhya *et al.*, 2016).

El incremento en la temperatura de la masa de fermentación durante este proceso es causada por la oxidación del alcohol, que es un proceso exotérmico, lo cual provoca la elevación de la temperatura de la masa fermentativa, llegándose a alcanzar temperaturas superiores a los 45° C (De Vuyst y Weckx, 2016; Gutiérrez, 2017). Algunos investigadores incluso han llegado a reportar temperaturas de la masa fermentativa que superan los 50°C durante fermentaciones realizadas con más de 100 kg (Lagunes- Gálvez *et al.*, 2007; Hernández-Hernández *et al.*, 2016; Papalexandratou *et al.*, 2019), mientras que para el caso de fermentaciones realizadas a pequeña escala se han reportado temperaturas cercanas a los 45°C (Pereira *et al.*, 2012; Sandhya *et al.*, 2016).

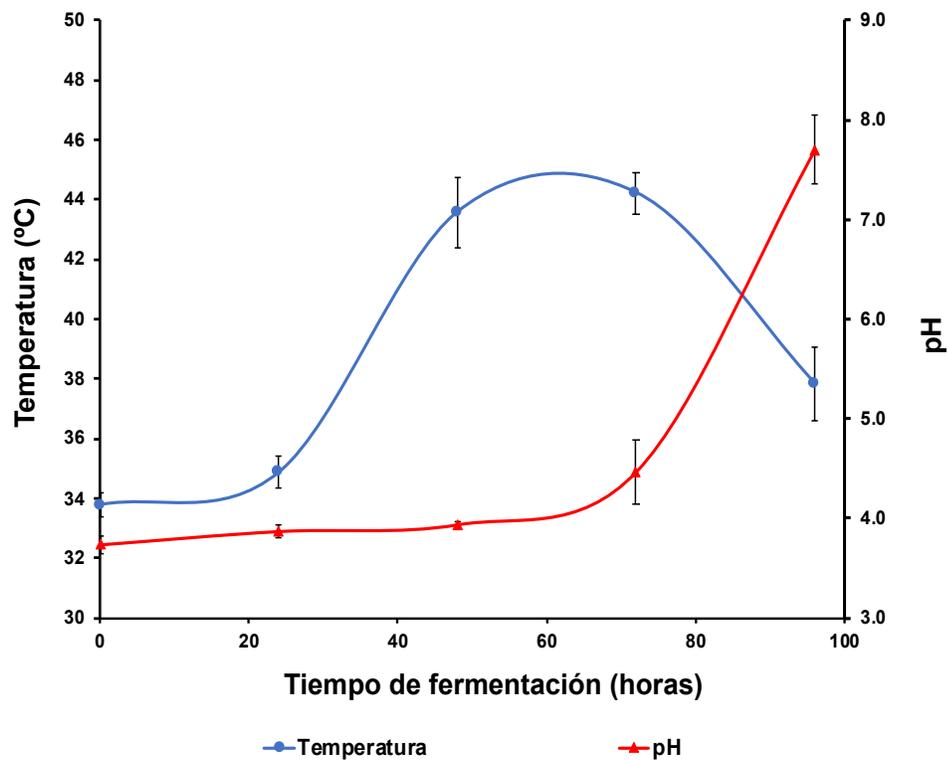


FIGURA 6.1 Seguimiento de temperatura y pH durante la fermentación del cacao

Para el caso del pH se observó que el pH se incrementó ligeramente de un valor de 3.7 a 3.9 a las 48 horas de fermentación, sin embargo, el valor pH se incrementó hasta llegar a un valor de 7.7 al término de la fermentación (ver Figura 6.1). Se ha observado que el valor de pH de la pulpa de cacao sin fermentar se encuentra entre 3.8 a 4.0. Este valor de pH puede incrementarse por el crecimiento de las levaduras y por la utilización del ácido cítrico (Sandhya *et al.*, 2016). No obstante, un alto incremento del valor de pH de la masa fermentativa ha sido asociada a la presencia de especies fúngicas en el proceso, las cuales son indeseables no solo por la producción de aromas y sabores indeseables sino también porque algunas especies pueden producir micotoxinas (Schwan y Wheals, 2004; Gilmour y Lindblom, 2008; Copetti *et al.*, 2010, 2011). Lo cual fue observado en este proceso fermentativo.

6.2 Aislamiento de BAL de la fermentación de cacao

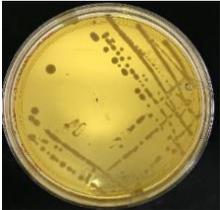
A partir de las fermentaciones realizadas durante las cosechas 2018-1 y 2 se lograron aislar doce bacterias, seis de la cosecha 2018-1 y otras seis de la cosecha 2018-2, las cuales fueron estudiadas para observar si mostraban tener las características morfológicas (macro y microscópica) y bioquímicas para ser identificadas presuntivamente como bacterias ácido-lácticas (BAL).

6.3 Caracterización morfológica y bioquímica de las BAL aisladas de la fermentación de cacao

6.3.1 Caracterización morfológica macroscópica

Las características morfológicas a nivel macroscópico de las bacterias aisladas durante las cosechas del cacao pueden observarse en la Tabla 6.1. Las características morfológicas a nivel macroscópico de algunas de las cepas bacterianas aisladas coinciden con las características de BAL observadas en otros trabajos. Patil *et al.* (2010) observaron que las colonias de BAL aisladas de muestras de pepino y cuajada presentaron colonias circulares ligeramente convexas con un margen entero y coloración crema o blanca.

TABLA 6.1 Características morfológicas de las colonias bacterianas aisladas en medio MRS e incubadas a 30°C

Cepa bacteriana	Características morfológicas	Cepa bacteriana	Características morfológicas
<p>BAL 1 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Irregular Tamaño: 1-2mm Margen: Entero Color: Blanco-Amarillento Elevación: Convexa Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p>BAL 7 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: circular Tamaño: 2-3 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Convexa Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>
<p>BAL 2 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Puntiforme Tamaño: 0.5 -1 mm Margen: ondulado Color: Blanco Elevación: Plano Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p>BAL 8 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: Fusiforme Tamaño: 1 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Elevada Textura: Seca Apariencia: Mate Propiedad óptica: opaca</p>

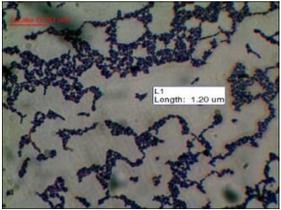
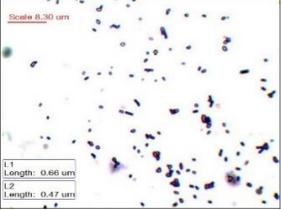
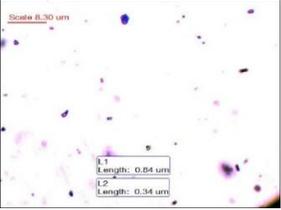
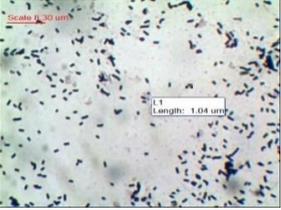
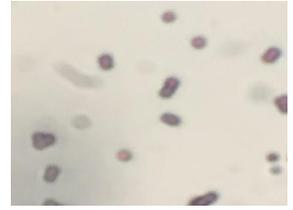
Cepa bacteriana	Características morfológicas	Cepa bacteriana	Características morfológicas
<p>BAL 3 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Circular Tamaño: 1-3 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Convexa Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p>BAL 9 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: Circular Tamaño: 1-2 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Plana Textura: Cremosa Apariencia: Opaca Propiedad óptica: opaca</p>
<p>BAL 4 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Irregular Tamaño: 0.5 -1 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Plano Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p>BAL 10 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: Circular Tamaño: 1 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Convexa Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: Traslucida</p>
<p>BAL 5 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Irregular Tamaño: 1-3 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Elevada Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p>BAL 11 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: Circular Tamaño: 2 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Convexa Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>

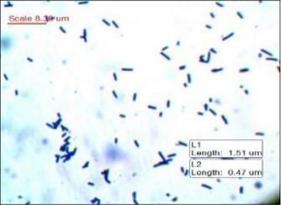
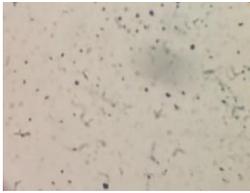
Cepa bacteriana	Características morfológicas	Cepa bacteriana	Características morfológicas
<p style="text-align: center;">BAL 6 COSECHA 2018-1</p> 	<p>Forma: Circular Tamaño: 1-2 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: Elevado Textura: Cremosa Apariencia: Brillante Propiedad óptica: opaca</p>	<p style="text-align: center;">BAL 12 COSECHA 2018-2</p> 	<p>Forma: Circular con halo Tamaño: 4 mm Margen: Entero Color: Blanco Elevación: plano Textura: Cremosa Apariencia: opaca Propiedad óptica: opaca</p>

6.3.2 Caracterización morfológica microscópica de las bacterias aisladas de la fermentación del cacao

Posteriormente se realizó la caracterización morfológica microscópica de las colonias bacterianas aisladas durante la fermentación del cacao mediante la observación microscópica de las colonias y la tinción de Gram. En esta caracterización se pueden observar la agrupación de los microorganismos, el tipo de componentes de su pared celular (tinción de Gram) y la forma de las células bacterianas. Los resultados se muestran en la Tabla 6.2, en la cual se observa que todas las bacterias aisladas del proceso de fermentación de cacao fueron Gram positivas, encontrándose cuatro cocos y ocho bacilos.

TABLA 6.2. Morfología microscópica de las colonias bacterianas aisladas observadas en microscopio de campo claro con objetivo de inmersión (100x)

Cepa bacteriana	Características morfológicas	Cepa bacteriana	Características morfológicas
 <p>BAL 1</p>	Bacilos agrupados Gram +	 <p>BAL 7</p>	Bacilos cortos Gram +
 <p>BAL 2</p>	Bacilos en cadena Gram +	 <p>BAL 8</p>	Bacilos cortos agrupados Gram +
 <p>BAL 3</p>	Cocos separados Gram +	 <p>BAL 9</p>	Bacilos cortos en cadena Gram +
 <p>BAL 4</p>	Bacilos separados Gram +	 <p>BAL 10</p>	Cocos agrupados Gram +/-
 <p>BAL 5</p>	Bacilos en cadena Gram +	 <p>BAL 11</p>	Cocos pequeños agrupados Gram +/-

Cepa bacteriana	Características morfológicas	Cepa bacteriana	Características morfológicas
 <p>BAL6</p>	<p>Bacilos en cadena Gram +</p>	 <p>BAL 12</p>	<p>Cocos separados Gram +/-</p>

6.4 Caracterización bioquímica de las bacterias aisladas de la fermentación del cacao

6.4.1 Pruebas de Catalasa y Oxidasa

Debido a que las bacterias ácido-lácticas son microorganismos catalasa y oxidasa negativos se realizaron estas pruebas para observar cuales de las bacterias aisladas de la fermentación cumplieron con esta característica. Los resultados de las pruebas son mostrados en la Tabla 6.3, en la cual se observa que las cepas bacterianas codificadas como BAL 10, 11, y 12, no cumplieron con este requisito y por eso no se consideraron para las pruebas siguientes.

TABLA 6.3. Resultados de las pruebas de catalasa y oxidasa de las bacterias aisladas de la fermentación del grano de cacao

Cepa bacteriana	Catalasa	Oxidasa
BAL 1	(-)	(-)
BAL 2	(-)	(-)
BAL 3	(-)	(-)
BAL 4	(-)	(-)
BAL 5	(-)	(-)
BAL 6	(-)	(-)
BAL 7	(-)	(-)
BAL 8	(-)	(-)
BAL 9	(-)	(-)
BAL 10	(-)	(+)
BAL 11	(+)	(+)
BAL 12	(+)	(+)

6.4.2 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones de temperatura

En cuanto al crecimiento de las BAL en diferentes condiciones de temperatura se observó que ninguna de las cepas analizada presentó crecimiento a 4 y 8°C y solo una de las bacterias, la bacteria identificada como BAL 2 reportó crecimiento a los 45°C, por lo que se puede clasificar a esta BAL como termófila (Axelsson, 2004). El rango de temperaturas en donde se observa un mayor crecimiento de las cepas bacterianas fue de 25 a 37°C, como se observar en la Figura 6.4. Se ha reportado que las BAL pueden crecer en un rango de temperaturas entre 5 a 45°C (Özcelik *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Khadidja *et al.* (2018) estudiaron y caracterizaron cepas de BAL (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y

Lactococcus lactis ssp. *lactis*) aisladas de la fermentación de hamoum, un alimento de trigo que se consume en Algeria, las cuales presentaron su mayor crecimiento a ese mismo rango de temperaturas.

TABLA 6.4. Crecimiento de las cepas de BAL a condiciones de temperaturas

Cepa de BAL	4° C	8° C	25° C	30° C	37° C	45° C
BAL 1	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
BAL 2	(-)	(-)	(-)	(+)	(++)	(+++)
BAL 3	(-)	(-)	(+)	(+++)	(+++)	(-)
BAL 4	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
BAL 5	(-)	(-)	(++)	(+++)	(++)	(-)
BAL 6	(-)	(-)	(++)	(+++)	(++)	(-)
BAL 7	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
BAL 8	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
BAL 9	(-)	(-)	(++)	(+++)	(+++)	(-)

(+): 0.5 a 1.0 de Abs, (++): 1.0 a 1.5 de Abs, (+++): 1.5 a 2.0 de Abs, (-): sin crecimiento

6.4.3 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones de pH

Con respecto a las pruebas de crecimiento a diferentes valores de pH (2, 4, 6 y 8), se observó que ninguna de las cepas bacterianas analizadas puede crecer en medio MRS con el pH modificado a un valor de 2. Por otro lado, todas las bacterias estudiadas presentaron crecimiento en el medio MRS con el pH modificado en un rango entre 4 y 8. Se ha reportado que el rango óptimo de pH de las BAL se encuentra entre 5.5 y 6.5 (Özcelik *et al.*, 2016). En un estudio realizado por Khadidja *et al.* (2018) estudiaron y caracterizaron cepas de BAL (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*) aisladas de la fermentación de hamoum. Los autores observaron que solo algunas cepas de *Lb. plantarum* pueden crecer en

MRS con el pH modificado a 4 y 8, mientras que las cepas de *Lb. brevis* y *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* solo pueden crecer en MRS con el pH modificado a 4 y 8, respectivamente. Esto contrasta con lo observado en este trabajo, ya que todas las cepas de BAL estudiadas pueden crecer en medio MRS con el pH modificado en un rango entre el 4 y 8.

6.4.4 Prueba de crecimiento de las BAL aisladas de la fermentación del cacao a diferentes condiciones salinas

En cuanto a las pruebas de crecimiento en medios con diferentes concentraciones salinas (2, 4 y 6.5%), se observó que todas las cepas bacterianas estudiadas presentaron crecimiento en medios MRS adicionado con el 2% de NaCl (Tabla 6.5). Para el caso del crecimiento de las bacterias en condiciones salinas al 4%, solo la BAL no demostró crecimiento mientras que a concentraciones mayores de NaCl en medio, solo las bacterias codificadas como BAL1, BAL 3, BAL 4, BAL 7, BAL 8 Y BAL 9 mostraron crecimiento. En un estudio realizado por Khadidja *et al.* (2018), mencionado anteriormente también se encontró que solo algunas cepas de *Lb. plantarum* y *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* pueden crecer en medio MRS adicionado con el 2, 4 y 6.5% de NaCl, mientras que ninguna de las cepas de *Lb. brevis* creció a esas condiciones, lo cual contrasta con los resultados obtenidos en este estudio, en donde solamente la BAL 4 no mostro crecimiento en las concentraciones salinas de 4 y 6.5%, mientras que la BAL 5 y 6 solamente al 6.5% de NaCl.

TABLA 6.5. Crecimiento a diferentes concentraciones salinas (2, 4 y 6.5% de NaCl)

Cepa de BAL	2% NaCl	4% NaCl	6.5% NaCl
BAL 1	(+++)	(+++)	(+)
BAL 2	(+)	(-)	(-)
BAL 3	(++)	(++)	(+)
BAL 4	(+++)	(+++)	(+)
BAL 5	(+++)	(+)	(-)
BAL 6	(+++)	(+)	(-)
BAL 7	(+++)	(+++)	(+++)
BAL 8	(+++)	(+++)	(+++)
BAL 9	(+++)	(+++)	(+++)

(+): 0.5 a 1.0 de Abs, (++): 1.0 a 1.5 de Abs, (+++): 1.5 a 2.0 de Abs, (-): sin crecimiento. las cepas fueron incubadas a 30°C

6.4.5 Pruebas de la capacidad de producción de dióxido de carbono (CO₂) de las BAL aisladas de la fermentación del cacao

Como parte de la caracterización bioquímica de las BAL aisladas de la fermentación de cacao, también se realizó la prueba de producción de dióxido de carbono (CO₂), observándose que todas las cepas de BAL aisladas con excepción de la BAL3 tienen la capacidad de producir CO₂ (Figura 6.6). Uno de los principales criterios para lograr la clasificación sistemática de las BAL es la diferenciación del metabolismo como homofermentativo o heterofermentativo. La prueba de producción de dióxido de carbono mediante el empleo de las campanas de Durham es una prueba recomendada para poder clasificar el metabolismo de las BAL

(Müller, 1990). Por lo tanto, en este estudio se encontró que BAL estudiadas, con excepción de la BAL 3 pueden ser clasificadas como heterofermentativas.

TABLA 6.6. Capacidad de producción de dióxido de carbono por las cepas incubadas a 30° C

Cepa de BAL	Producción de CO ₂	Metabolismo
BAL 1	(+)	Heterofermentativo
BAL 2	(+)	Heterofermentativo
BAL 3	(-)	Homofermentativo
BAL 4	(+)	Heterofermentativo
BAL 5	(+)	Heterofermentativo
BAL 6	(+)	Heterofermentativo
BAL 7	(+)	Heterofermentativo
BAL 8	(+)	Heterofermentativo
BAL 9	(+)	Heterofermentativo

(-) = sin producción de CO₂, (+) = con producción de CO₂

6.5 Pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos de las BAL aisladas de la fermentación del cacao

Posteriormente se utilizó un sistema API 50 CHL para llevar a cabo las pruebas de fermentación y asimilación de carbohidratos de las BAL aisladas de la fermentación del cacao. Los resultados de las pruebas de asimilación y/o fermentación de los 49 carbohidratos para cada una de las cepas de las BAL se muestra en la Tabla 6.7. Los resultados de esta prueba permitieron constituir el perfil bioquímico y por lo tanto permiten la identificación presuntiva a nivel especie de las BAL (ver Apéndice 10.2) con ayuda del programa API WEB™ (Biomérieux). Las

cepas de BAL aisladas del cacao fueron identificadas bioquímicamente como: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus brevis* y probablemente *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris*. Se ha reportado que el metabolismo de estas cepas de BAL identificadas bioquímicamente presenta un metabolismo heterofermentativo o heterofermentativo facultativo, lo cual coincide con lo encontrado en este estudio (Cicotello *et al.*, 2018; Alfano *et al.*, 2020; Verce *et al.*, 2020).

Se observó que el porcentaje de identificación de las BAL 2 y BAL 8 identificadas bioquímicamente como *Lb. fermentum* y *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*, respectivamente es menor al 90%, por lo que es necesario la realización de pruebas de identificación molecular para corroborar la identidad de estas cepas bacterianas, al igual que las cepas de BAL identificadas con un porcentaje superior al 90%.

TABLA 6.7. Perfil de fermentación y asimilación de carbohidratos de las BAL mediante el sistema API® CH50L

Carbohidrato	Cepa bacteriana								
	BAL 1	BAL 2	BAL 4	BAL 5 Y 6	BAL 7	BAL 8	BAL 9		
0 Control	-	-	-	-	-	-	-	-	
1 Glicerol	-	-	-	-	-	-	-	-	
2 Eritriol	-	-	-	-	-	-	-	-	
3 D-arabinosa	+	-	-	-	-	-	-	-	
4 L-arabinosa	+	+	+	-	+	-	+		
5 D-ribosa	-	+	+	+	+	-	+		
6 D-xilosa	-	+	+	+	-	-	-		
7 L-xilosa	-	-	-	-	-	-	-		
8 D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-		
9 Metil-β-d-xilopiranosida	-	-	+	+	-	-	-		
10 D-galactosa	+	+	+	+	+	-	+		
11 D-glucosa	+	+	+	+	+	-	+		

Carboidrato	Cepa bacteriana								
	BAL 1	BAL 2	BAL 4	BAL 5 Y 6	BAL 7	BAL 8	BAL 9		
12 D-fructosa	+	+	+	+	+	-	+		
13 D-manosa	+	-	+	-	+	-	+		
14 L-sorbosa	-	-	-	-	-	-	-		
15 L-ramnosa	-	-	-	-	+	-	+		
16 Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-		
17 Inositol	-	-	-	-	-	-	-		
18 D-mantol	+	-	+	-	+	+	+		
19 D-sorbitol	+	-	-	-	-	-	+		
20 Metil- α - manopiranosida	+	-	+	-	+	-	+		
21 Metil- α - glucopiranosida	-	-	-	-	-	-	+		
22 N- acetilglucosamina	+	-	+	+	+	-	+		
23 Amigdalina	+	-	+	-	+	-	+		

Carbohidrato	Cepa bacteriana								
	BAL 1	BAL 2	BAL 4	BAL 5 Y 6	BAL 7	BAL 8	BAL 9		
24 Arbutina	+	-	+	-	+	-	+		
25 Esculina	+	-	+	+	+	-	+		
26 Salicina	+	-	+	-	+	-	+		
27 D-celobiosa	+	-	+	-	+	-	+		
28 D-maltosa	+	+	+	+	+	-	+		
29 D-lactosa	+	-	+	-	+	-	+		
30 D-melibiosa	+	+	+	+	+	-	+		
31 D-sacarosa	+	+	+	-	+	-	+		
32 D-trealosa	+	+	+	-	+	-	+		
33 Inulina	-	-	-	-	-	-	-		
34 D-melezitosa	+	-	+	-	+	-	+		
35 D-rafinosa	+	+	+	-	+	-	+		
36 Almidón	-	-	-	-	-	-	-		
37 Glucógeno	-	-	-	-	-	-	-		
38 Xilitol	-	-	-	-	-	-	-		

Carbohidrato	Cepa bacteriana								
	BAL 1	BAL 2	BAL 4	BAL 5 Y 6	BAL 7	BAL 8	BAL 9		
39 Gentiobiosa	+	-	+	-	+	-	+		
40 D-turanosa	+	-	+	-	+	-	+		
41 D-lixosa	-	-	-	-	-	-	-		
42 D-tagatosa	-	-	-	-	-	-	-		
43 D-fucosa	-	-	-	-	-	-	-		
44 L-fucosa	-	-	-	-	-	-	-		
45 D-arabitol	-	-	-	-	+	-	+		
46 L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-		
47 Gluconato	+	+	-	-	+	-	+		
48 2- Cetogluconato	-	-	-	-	-	-	-		
49 5-Cetogluconato	-	+	-	+	-	-	-		
Identificación bioquímica	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1 99.9%ID	<i>Lactobacillus fermentum</i> 82.5%ID	<i>Lactobacillus plantarum</i> 2 96.7%ID	<i>Lactobacillus brevis</i> (1-2) 95.7%ID	<i>Lactobacillus plantarum</i> 3 99.9%ID	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>cremoris</i> 86.9%ID	<i>Lactobacillus plantarum</i> 4 99.9%ID		

La diversidad microbiana durante el proceso de fermentación es dependiente de la localización geográfica, la variedad del cacao utilizado y el método de fermentación empleado (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). Se ha identificado que existen ciertos microorganismos que han sido encontrados en una gran variedad de estudios realizados en todo el mundo, los cuales son *Pichia kudriavzevii*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora opuntiae*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum* y *Acetobacter pasteriaunus* (Figueroa-Hernández *et al.*, 2019; Papalexandratou *et al.*, 2013). Sin embargo, estas especies microbianas no están presentes en todos los procesos fermentativos realizados en el mundo. En el caso de México, no se ha caracterizado la diversidad bacteriana implicada en el proceso, existiendo solo un estudio acerca de la diversidad de levaduras (Arana-Sánchez *et al.*, 2015), señalando la relevancia de la realización de este tipo de investigaciones.

Las bacterias ácido-lácticas presuntamente identificadas como *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* y *Leuc. mesenteroides* han sido reportadas como parte de la diversidad microbiana del proceso fermentativo, sin embargo, las dos primeras han sido las más frecuentemente encontradas (Kostinek *et al.*, 2008; Illegghems *et al.*, 2012; Papalexandratou *et al.*, 2013; Miescher-Schwenninger *et al.*, 2016; Figueroa-Hernández *et al.*, 2019). La identidad de las cepas de BAL encontrada por métodos bioquímicos debe de corroborarse mediante técnicas moleculares de identificación microbiana.

6.6 Pruebas de actividad antifúngica de los cultivos celulares de las BAL y los extractos libres de células sobre la germinación de esporas

6.6.1 Prueba de actividad antifúngica de los cultivos celulares de las BAL sobre la germinación de esporas de *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*

Los resultados de la prueba de confrontación de los cultivos celulares de cada una de las BAL aisladas del proceso de fermentación del cacao contra las esporas de las cepas de hongos toxigénicos del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*), se muestran en la Tabla 6.8. En esta tabla se observa que, a las condiciones probadas, el crecimiento a las 72 horas de *A. flavus* se ve inhibido por

las células de las BAL, con excepción de la BAL 3 y *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* (BAL 8). Para el caso de *A. carbonarius* se observó que todas las cepas de BAL estudiadas con excepción de la BAL 3 presentaron un efecto inhibitorio sobre su crecimiento a las 72 horas. En el caso de *A. ochraceus* todas las cepas de BAL estudiadas inhiben su crecimiento, por lo que esta cepa fúngica presentó una mayor susceptibilidad a la presencia del cultivo de las bacterias ácido-lácticas (ver Apéndice 10.3). Al observar al microscopio los cultivos de 72 horas se observó que en algunas muestras existió una inhibición de la esporulación, mientras que en otras solo se encontró un desarrollo incompleto del hongo.

TABLA 6.8 Resultados de la prueba de germinación de las tres cepas de hongos toxigénicos incubadas a 30°C

Bacteria \ Hongo	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	-	-	-
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	-	-	-
BAL 3 (<i>No identificado</i>)	+	+	-
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	-	-	-
BAL 5 (<i>Lb. brevis</i> 1)	-	-	-
BAL 6 (<i>Lb. brevis</i> 2)	-	-	-
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	-	-	-
BAL 8 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	+	-	-
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	-	-	-

(+): crecimiento del hongo, (-): inhibición del crecimiento del hongo.

La inhibición del crecimiento fúngico en estas pruebas de confrontación pudo deberse a alguno de los tres mecanismos siguientes: competencia por nutrientes,

reducción del pH del medio, y producción de metabolitos con potencial antifúngico (Magnusson *et al.*, 2003; Bianchini y Bullerman, 2009; Dalie *et al.*, 2010; Leyva Salas *et al.*, 2017). El grado de inhibición fúngica por medio de microorganismos antagónicos, como las BAL, es un proceso complejo que depende principalmente de los factores abióticos y bióticos de la materia prima, alimento o medio de cultivo, de las características fisiológicas y bioquímicas del hongo, y de las características del microorganismo antagónico y/o el compuesto con actividad antifúngica (Magnusson *et al.*, 2003; Zalán *et al.*, 2010; Leyva Salas *et al.*, 2017).

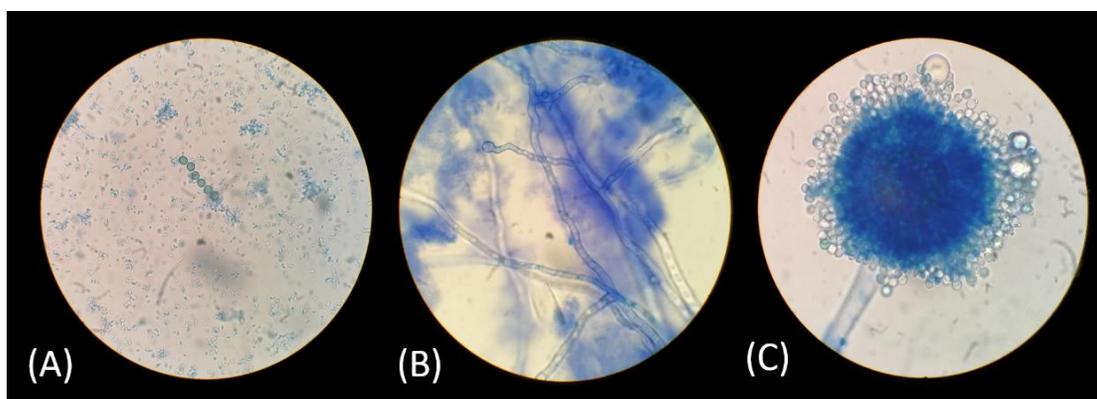


FIGURA 6.2 Imágenes de las pruebas de confrontación BAL contra hongo, A) Inhibición de la esporulación (72 h), B) Desarrollo incompleto del hongo (72), C) Desarrollo completo del hongo (72h)

En este sentido, en un estudio realizado por Crowley *et al.* (2013b) se identificaron que las cepas de *Lb. plantarum* fueron las que presentaron un mayor efecto inhibitorio contra el crecimiento de *Penicillium expansum*. En este trabajo se evaluaron alrededor de las 7000 cepas de BAL aisladas de diversas fuentes alimentarias. Posteriormente en el estudio realizado por Cheong *et al.* (2014) también se observó que el efecto antifúngico ejercido BAL sobre el crecimiento de *Penicillium commune* era cepa-dependiente. Estos autores también encontraron que las cepas de *Lb. plantarum* aisladas de diversas fuentes alimentarias fueron las que presentaron un mayor efecto, sin embargo, concluyen que no todas las bacterias ácido-lácticas de un mismo género pueden ser utilizadas como biocontrol

y que se requieren realizar los análisis genotípicos para poder diferenciar a las diferentes cepas bacterianas. Manini *et al.* (2016) observaron que algunas cepas de BAL autóctonas de la fermentación de masa madre de salvado de trigo, entre las que destacan *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, *Leuc. mesenteroides*, *Lb. rhamnosus* y *Pediococcus pentosaceus* tuvieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. oryzae* y *A. niger*. De todas las cepas de BAL estudiadas las que mostraron un mayor efecto antifúngico fueron las cepas de *Lb. plantarum* y *P. pentosaceus*, encontrándose una mayor susceptibilidad en *A. oryzae*. Las pruebas de confrontación BAL-hongo de los dos estudios anteriores se realizaron en medio sólido. Matei *et al.* (2015) evaluaron el efecto antifúngico de ocho cepas de BAL, seis de ellas aisladas de productos fermentados de Rumania y dos cepas comerciales (*Lb. paracasei* IC 13239 and *Lb. plantarum* ATCC 8014) contra el crecimiento de *Penicillium digitatum* en medio líquido (caldo de papa-dextrosa). Los autores encontraron que cuatro cepas identificadas como Lpa, LAB13, LAB15 inhibieron totalmente el crecimiento del micelio mientras que las otras dos cepas (LAB43 y LAB58) solamente causaban un retraso en la formación de la biopelícula fúngica en la superficie del medio de cultivo líquido utilizado, como lo observado en este trabajo (ver Apéndice 10.3). Además, los autores sugirieron que la prueba de confrontación en medio líquidos era más sensible que la realizada en medio sólido, posiblemente debido a que podría haber una mayor difusión de los compuestos con actividad antifúngica hacia el medio.

Todos estos estudios evidencian la gran potencialidad que tienen algunas de las BAL autóctonas de la fermentación del cacao (*Lb. plantarum*, *Lb. brevis* y *Leuc. mesenteroides*) para ejercer un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de algunos hongos, sin embargo, su efecto depende también de la susceptibilidad que presente la cepa fúngica durante las pruebas de confrontación. En este sentido, los géneros más utilizados en las pruebas de confrontación con BAL son *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2003; Sjögren *et al.*, 2003; Coloretti *et al.*, 2007; Dal Bello *et al.*, 2007; Sathe *et al.*, 2007; Rouse *et al.*, 2008; Falguni *et al.*, 2010; Mauch *et al.*, 2010; Prema *et al.*, 2010; Ndagano *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012; Romanens *et al.*, 2019; Ruggirello *et al.*, 2019). En la

mayoría de los estudios realizados de biocontrol con BAL sobre de *Aspergillus* han utilizado las especies de *flavus*, *fumigatus* y *niger* (Lind *et al.*, 2007; Rouse *et al.*, 2008; Falguni *et al.*, 2010; Prema *et al.*, 2010; Romanens *et al.*, 2019; Ruggirello *et al.*, 2019), mientras que otras especies como *A. ochraceus* y *A. carbonarius* (Lee y Chang, 2016; Shehata *et al.*, 2019) han sido poco estudiadas, lo cual pone de manifiesto la necesidad de realizar este tipo de estudio con estas especies.

6.6.2 Prueba de actividad antifúngica de los extractos libres de células de BAL sobre la germinación de esporas de *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*

Los resultados de la prueba de confrontación de los extractos libres dan células de cada una de las BAL estudiadas contra las esporas de las cepas de hongos toxigénicos del género *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*), se muestra en la Tabla 6.9. En esta tabla se observa que, a las condiciones probadas, el crecimiento a las 72 horas de *A. flavus* se ve inhibido por los extractos libres de células de todas las BAL, con excepción de la BAL 3. Lo mismo se observa para *A. carbonarius*. En el caso de *A. ochraceus* todos los extractos libres de células tuvieron un efecto inhibitorio en su crecimiento, por lo que está cepa fúngica al igual que en la prueba anterior fue la que presentó una mayor susceptibilidad (ver Apéndice 10.4).

Prema *et al.* (2010) encontraron que el extracto libre de células de una cepa de *Lb. plantarum* aislada de un ensilado presentó un efecto inhibitorio del crecimiento de varias cepas de *Aspergillus*, entre las que destacaban *A. niger*, *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. terreus* entre otras. La actividad antifúngica de este extracto se debía a la producción del ácido 3-fenil-láctico por la cepa de *Lb. plantarum* utilizada. En otro estudio realizado por Luz *et al.* (2017) se evaluó la actividad antifúngica de los extractos libres de células de cuatro BAL (*Lb. rhamnosus*, *Lb. johnsoni*, *Lb. plantarum* y *Lb. delbrueckii bulgaricus* contra *A. parasiticus* y *P. expansum*. El extracto libre de células que presentó una mayor actividad fue el obtenido por *Lb. plantarum*, mostró la mayor actividad de inhibición. El efecto inhibitorio del extracto fue atribuido a la presencia de tres péptidos en el extracto (SGADTTFLTK, GTLIGQDYK y LVGKKVQTF). Marie *et al.* (2018) estudiaron el potencial evaluar la

actividad antifúngica de cepas de BAL aisladas de diferentes alimentos de Camerún contra hongos toxigénicos y de descomposición, de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. La cepa de BAL, *Lb. plantarum* LO3 fue la que presentó un mayor efecto inhibitorio en el crecimiento de los hongos evaluados (*A. flavus*, *A. niger*, *P. citrunum* y *P. verrocosum*), por lo tanto se estudió el efecto del extracto libre de células sobre el crecimiento de *A. flavus*, mostrando también una considerable actividad antifúngica, la cual se debió a la producción de ácidos orgánicos entre los que destacan láctico, acético, 3-fenil-láctico y 4-hidroxi-3-fenil-láctico. Estos resultados muestran la gran potencialidad que tiene el extracto libre de células de cepas de *Lb. plantarum* para ejercer un efecto inhibitorio en el crecimiento de diversas especies de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. En el caso de los extractos libres de células de las otras BAL, Arasu et al. (2014) encontraron que una cepa de *Lb. brevis* aislada de pepinillos tenía la capacidad de producir ácido para-hidroxibenzoico, el cual presentó un efecto inhibitorio contra varias especies de hongos del género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. En otro estudio realizado por Falguni et al. (2010) se demostró también la capacidad inhibitoria del extracto libre de células de *Lb. brevis* sobre el crecimiento de *Penicillium camemberti*, encontrándose que su efecto se debía a la producción de compuestos de naturaleza proteica.

Por otro lado, Gerez et al. (2013) observaron que el extracto libre de células de una cepa de *Lb. fermentum* aislada de productos lácteos presentó un efecto inhibitorio significativo contra el crecimiento de algunas cepas de hongos como *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.* y *Fusarium graminearum*. El potencial antifúngico de este extracto se debía a la producción de péptidos menores a 10kDa y con termoestabilidad a las condiciones probadas en ese estudio. También se ha reportado que el extracto libre de células de una cepa de *Leuc. mesenteroides* aislada del kimchi mostró tener una actividad antifúngica significativa contra el crecimiento de *A. ochraceus* y *A. flavus*, y que su efecto se debía a la producción de ácidos orgánicos y otros compuestos hidrofóbicos no identificados (Lee y Chang, 2016).

TABLA 6.9 Resultados de la prueba de germinación de las tres cepas de hongos toxigénicos utilizando los extractos libres de células incubadas a 30°C

Hongo Extracto de BAL	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus carbonarius</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	-	-	-
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	-	-	-
BAL 3 (<i>No identificado</i>)	+	+	-
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	-	-	-
BAL 5 (<i>Lb. brevis</i> 1)	-	-	-
BAL 6 (<i>Lb. brevis</i> 2)	-	-	-
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	-	-	-
BAL 8 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)	-	-	-
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	-	-	-

(+): crecimiento del hongo, (-): inhibición del crecimiento del hongo

6.9. Determinación de la actividad antifúngica del extracto libre de células

Para cuantificar la actividad antifúngica de los extractos libres de células de cada una de las BAL sobre el efecto en el crecimiento de los tres hongos del género estudiados se llevó una prueba de confrontación en microplacas utilizando la metodología propuesta por Ruggirello *et al.* 2019. Con los resultados de esta prueba se calculó el porcentaje de inhibición fúngica mediante la mencionada en la sección 5.5.3. Los valores del porcentaje inhibición fúngica son mostrados en la Figura 6.3, en donde se observa que todos los hongos presentan diferente susceptibilidad a los extractos libres de células de las BAL. En el caso de *A. flavus* se observó que el extracto libre de células de *Lb. brevis* 2 (BAL 6) fue la que tuvo un menor efecto inhibitorio (73%) mientras que todos los demás extractos muestran un efecto

inhibitorio superior al 80%. En el caso de *A. carbonarius* el extracto libre de células de *Lb. fermentum* (BAL 2) y *Lb. plantarum* 3 (BAL 7) fueron los que presentaron un mayor efecto inhibitorio (97%) mientras los extractos libres de células de *Lb. plantarum* 2 (BAL 4) y *Lb. brevis* 1 (BAL 5) fueron los que tuvieron un menor efecto inhibitorio con 77 y 68%, respectivamente. Todos los extractos libres de las BAL estudiadas mostraron tener el mismo efecto inhibitorio (90%) contra la cepa de *A. ochraceus* estudiada, lo que pone de manifiesto que es la cepa fúngica que presentó una mayor susceptibilidad tanto a los extractos libres como a las células de las BAL estudiadas. El extracto libre de células de la cepa identificada como BAL 3 no mostró tener efecto, por esa razón no se muestra en la Figura 6.5.

En el estudio de Ruggirello *et al.* (2019) realizaron pruebas de confrontación en microplacas con los extractos libres de células de varias cepas de *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* aisladas del proceso de fermentación del cacao contra el crecimiento de algunos hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium*. Los autores cuantificaron que el efecto inhibitorio en el crecimiento de *A. flavus* de los extractos libres de células de *Lb. fermentum* variaba del 36 al 100%, mientras que en el caso de los extractos de *Lb. plantarum* su actividad variaba del 30 al 100%. Por lo que se observa que los extractos libres de células de *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum* analizados en este estudio concuerdan con lo observado por estos autores.

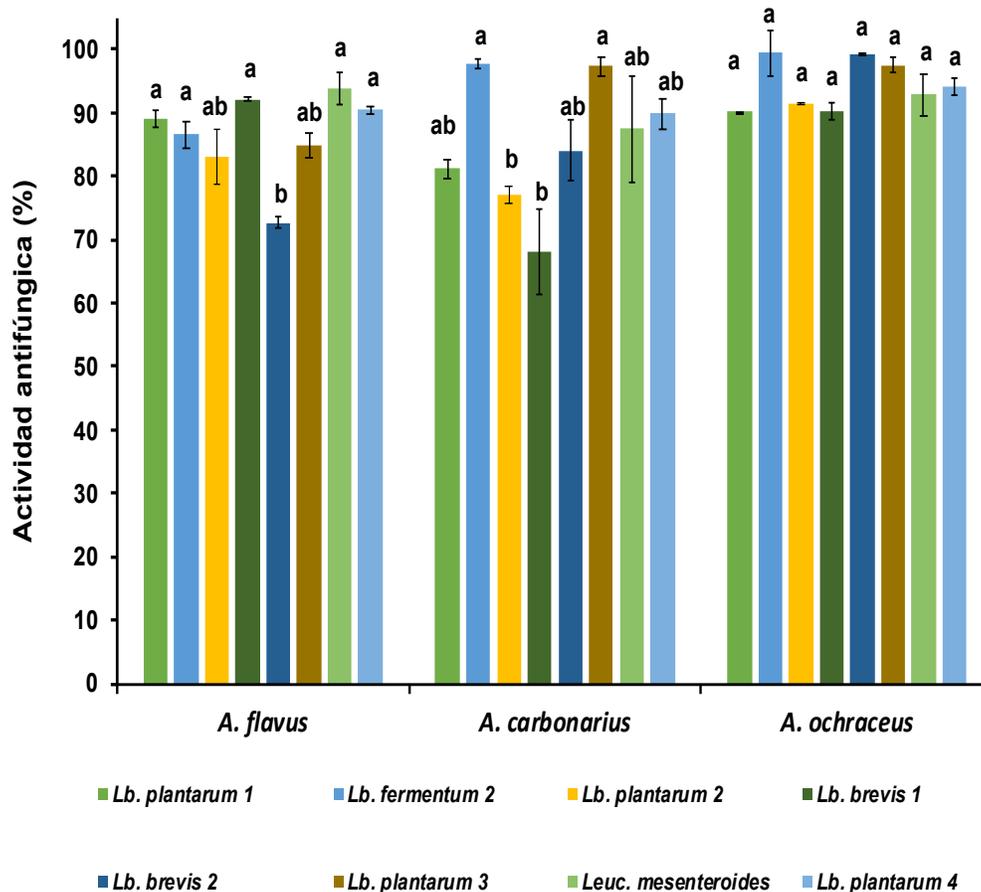


FIGURA 6.3. Actividad antifúngica (%) de los extractos libres de células de BAL sobre el crecimiento de los hongos del género *Aspergillus*

A partir de los resultados de esta prueba se observó que los extractos libres de células de *Lb. plantarum*, *Lb. plantarum* y *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris* son los que muestran un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos del género *Aspergillus* estudiados. sin embargo, solamente se determinó la naturaleza química de los compuestos con potencial antifúngico de los extractos libres de células de *Lb. plantarum* (BAL 1, 4, 7 y 9) y *Lb. fermentum* debido a que se ha relacionado a algunas cepas de *Leuconostoc mesenteroides* con infecciones en pacientes inmunocomprometidos (Bou *et al.*, 2008; Ishiyama *et al.*, 2011; Barletta *et al.*, 2017) mientras que los extractos libres de células de *Lb. brevis* mostraron tener un menor efecto antifúngico que los extractos de *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum*.

6.10. Determinación de la naturaleza química de los compuestos con actividad antifúngica

Para observar la naturaleza química de los compuestos que se encuentran en el extracto libre de células de las BAL que presentaron un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento fúngico, se realizó una serie de pruebas mencionadas en la sección 5.6. en la cual primeramente se elimina el efecto de la producción de ácidos, posteriormente el efecto de la producción de peróxido de hidrógeno y finalmente el efecto de la producción de compuestos de naturaleza proteica. Los extractos libres de células seleccionados para la realización de esta serie de pruebas fueron los de *Lb. fermentum* y *Lb. plantarum* (BAL 1, 2, 4, 7 y 9) que fueron las que mostraron tener un mayor efecto inhibitorio (ver Apéndice 10.5). Los resultados de esta prueba se pueden observar en la Tabla 6.10. En la tabla puede observarse que los extractos libres de células de *Lb. plantarum* 1, 2 y 4 pierden su actividad al eliminar el efecto de los ácidos. Por lo tanto, la actividad antifúngica de estos extractos se debe a la producción de ácidos orgánicos por la bacteria ácido-láctica. Los extractos libres de células de *Lb. plantarum* pierden su efecto antifúngico al eliminar el efecto combinado de la producción de ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno. En el caso del extracto libre de células de *Lb. fermentum* (BAL 2) se observó que este conserva todavía su efecto antifúngico incluso después de realizar la proteólisis con proteinasa K, por esta razón se atribuye que el efecto de este extracto se debe a la producción de otro tipo de compuestos que pueden presentar este efecto como algunos ácidos grasos hidroxilados (ácido 2-hidroxi-4-metilpentanoico), lactonas (mevanolactona) o compuestos orgánicos volátiles (ácido bencenoacético y 2-propenil-éster), como se ha reportado en otros estudios (Paavola *et al.*, 1999; Ndagano *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012).

TABLA 6.10. Efecto de la producción de ácidos orgánicos en la actividad antifúngica de los extractos libres de células de las BAL incubadas a 30°C

Extracto libre de células con pH ajustado a 7 contra crecimiento de hongo (48 h)			
Hongo Extracto	<i>A. flavus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. ochraceus</i>
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	+	+	+
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	-	-	-
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	+	+	+
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	+	+ -	+ -
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	+	+	+
Extracto libre de células con pH ajustado a 7 y adición de catalasa contra crecimiento de hongos (48 h)			
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	+	+	+
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	-	+ -	+ -
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	+	+	+
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	+	+	+
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	+	+	+
Extracto libre de células con pH ajustado a 7 y adición de catalasa y proteinasa K contra crecimiento de hongos (48 h)			
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	+	+	+
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	-	+ -	+ -
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	+	+	+
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	+	+	+
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	+	+	+

(+): crecimiento del hongo, (+ -): ligero crecimiento del hongo, (-): inhibición del crecimiento del hongo

6.12. Cuantificación de los principales compuestos con actividad antifúngica

El efecto de los extractos libres de células de las BAL estudiadas, con excepción del extracto producido por *Lb. fermentum* se debe principalmente a la capacidad de producción de ácidos orgánicos por esta razón se cuantificó la concentración de ácido láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico por HPLC (ver Apéndice 10.6). Estos ácidos orgánicos son los que están más relacionados con el efecto antifúngico ejercido por los extractos libres de células de las BAL (Crowley et al., 2013b; Gerez et al., 2013; Fernandez et al., 2017). En la tabla 6.11 se muestra la concentración de ácidos orgánicos en los extractos libres de células de las BAL. Las BAL que producen una mayor concentración de ácidos orgánicos son *Lb. plantarum* 1 (BAL 1) y *Lb. plantarum* 3 (BAL 7), mientras que *Lb. fermentum* fue la cepa que produjo una menor concentración de ácidos orgánicos. Esta baja producción de ácidos orgánicos probablemente pueda estar relacionada con la producción de otro tipo de compuestos que son los que tendrán un mayor efecto en su actividad antifúngica. Con respecto a la producción de cada uno de los ácidos por las BAL, se encontró que el ácido succínico se produce en una mayor concentración con las BAL 1 y 7, que son cepas de *Lb. plantarum*. Para el caso del ácido láctico la cepa de *Lb. fermentum* (BAL 2) fue la que lo produce en mayor concentración (556.8 mg/L) mientras que la BAL 1 fue la que produce en menor concentración (316.4 mg/L). En el caso de la producción de ácido acético y del ácido 3-fenil-láctico no se encontraron diferencias significativas entre las cepas de BAL estudiadas. Con respecto a los valores de pH encontrados en los extractos se observó que los extractos libres de células de todas las cepas de *Lb. plantarum* (BAL 1, 4, 7 y 9) fueron significativamente menores al encontrado en el extracto libre de células producido por *Lb. fermentum*.

TABLA 6.11 Cuantificación de ácidos orgánicos y valor de pH en los extractos libres de células de las BAL

Extracto libre de células	Concentración promedio de ácidos orgánicos (mg/L)					pH promedio del extracto libre de células
	Succínico	Láctico	Acético	3-fenil-láctico	Total	
BAL 1 (<i>Lb. plantarum</i> 1)	423.87 ^a	316.44 ^c	523.46 ^a	497.22 ^a	1761 ^{ab}	3.81 ^a
BAL 2 (<i>Lb. fermentum</i>)	162.20 ^b	556.86 ^a	0	495.70 ^a	1215 ^b	4.32 ^b
BAL 4 (<i>Lb. plantarum</i> 2)	137.89 ^b	448.57 ^b	271.98 ^a	630.66 ^a	1489 ^{ab}	3.71 ^a
BAL 7 (<i>Lb. plantarum</i> 3)	342.39 ^a	401.60 ^b	498.68 ^a	548.74 ^a	1791 ^a	3.72 ^a
BAL 9 (<i>Lb. plantarum</i> 4)	167.45 ^b	418.76 ^b	425.91 ^a	532.21 ^a	1544 ^{ab}	3.73 ^a

En el trabajo realizado por Özcelik *et al.* (2016) se encontraron concentraciones de 509 mg/L de ácido láctico y de 14,332 mg/L de ácido succínico en el extracto libre de células de 24 horas de *Lb. plantarum*, pero no se encontró la producción de ácido acético por esta bacteria. Al comparar las concentraciones de ácidos orgánicos de este extracto con las obtenidas en este trabajo, se observó que las concentraciones de ácido láctico y succínico fueron inferiores, sin embargo, hubo producción de ácido acético en todos los extractos libres de células de *Lb. plantarum* en un rango de 271 a 523 mg/L.

Con respecto a la concentración de ácido 3-fenil-láctico encontrada en los extractos libres de células se encontró una mayor concentración que la reportada por Zhang *et al.* (2014), de 229 mg/mL en el extracto de 24-horas de una cepa de *Lb. plantarum*. En la tabla 6.12 se muestran las concentraciones de ácido láctico,

acético y 3-fenil-láctico obtenidas en los extractos libres de células de *Lb. plantarum* y *Lb. fermentum*. Se observa que las concentraciones de ácido láctico en los extractos libres de células del presente trabajo son significativamente menores a las reportadas por otros investigadores. Estas diferencias podrían deberse a que la cuantificación de este ácido orgánico en los estudios mencionados se realizó empleando un detector de índice de refracción y una columna específica para la determinación de ácidos orgánicos (Crowley *et al.*, 2013b) o bien se emplearon columnas de intercambio iónico como en los trabajos realizados por Gerez *et al.* (2013) y Fernandez *et al.* (2017). Además, que la preparación de los extractos en los trabajos antes mencionados difiere al utilizado en este proyecto.

Con respecto a la concentración de ácido acético en los extractos de las BAL evaluadas en este estudio solo es mayor a la concentración reportada por Ndagano *et al.* (2011). Para el 3-fenil-láctico se observa que la máxima concentración reportada es de 5.2 (Gerez *et al.* 2010), cantidad ligeramente superior a la reportada en este trabajo.

TABLA 6.12 Comparación de las concentraciones obtenidas de ácido láctico, acético y 3-fenil-láctico con otros estudios

Cepa de BAL	Concentración de ácido láctico (mM)	
	Este trabajo	Otros trabajos
<i>Lb. plantarum 1</i>	3.51	209 (Crowley <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Lb. plantarum 2</i>	4.98	194.3 (Fernandez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lb. plantarum 3</i>	4.46	216.17 (Gerez <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lb. plantarum 4</i>	4.65	
<i>Lb. fermentum 1</i>	6.18	118.9 (Gerez <i>et al.</i> , 2013)
Cepa de BAL	Concentración de ácido acético (mM)	
	Este trabajo	Otros trabajos
<i>Lb. plantarum 1</i>	8.72	52 (Crowley <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Lb. plantarum 2</i>	4.53	32 (Fernandez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lb. plantarum 3</i>	8.30	12 (Gerez <i>et al.</i> , 2013)
<i>Lb. plantarum 4</i>	7.1	1.16 (Ndagano <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lb. fermentum 1</i>	-	26.3 (Gerez <i>et al.</i> , 2013)
Cepa de BAL	Concentración de ácido 3-fenil-láctico (mM)	
	Este trabajo	Otros trabajos
<i>Lb. plantarum 1</i>	3.65	0.7 (Crowley <i>et al.</i> , 2013b)
<i>Lb. plantarum 2</i>	4.63	0.5 (Fernandez <i>et al.</i> , 2017)
<i>Lb. plantarum 3</i>	4.03	1.38 (Zhang <i>et al.</i> , 2014)
<i>Lb. plantarum 4</i>	3.91	5.2 (Gerez <i>et al.</i> , 2010)
<i>Lb. fermentum 1</i>	3.64	

Se ha demostrado que cuando el efecto antifúngico de las BAL se atribuye principalmente a la producción de ácidos orgánicos por las BAL, como en el caso en este caso las cepas de *Lb. plantarum* aisladas del cacao, el pH del tiene una influencia significativa en este efecto. Los ácidos orgánicos, en su forma no disociada, que se producen por las BAL pueden penetrar las células fúngicas, por

lo tanto provocar una caída en el pH intracelular interrumpiendo su metabolismo (Brul y Coote, 1999; Guimarães *et al.*, 2018b). Por otro lado, se ha documentado en varios estudios que *Lb. plantarum* puede producir una gran cantidad de ácidos orgánicos que tiene un efecto antifúngico conocido como acético, láctico, propiónico, succínico, fenil-láctico, benzoico, fórmico, entre otros (Niku-Paavola *et al.*, 1999; Lavermicocca *et al.*, 2000; Ström *et al.*, 2002; Gerez *et al.*, 2009; Prema *et al.*, 2010; Rizzello *et al.*, 2011; Özcelik *et al.*, 2016; Guimarães, *et al.*, 2018a).

Se ha sugerido que la producción de ácido acético puede ser la razón principal por la cual las cepas de BAL heterofermentativas posean una actividad antifúngica y/o antimicrobiana mayor que las homofermentativas (Voulgari *et al.*, 2010; Guimarães *et al.*, 2018b). El ácido acético es un agente antifúngico más potente que el ácido láctico cuando se encuentra en ambientes ácidos, debido a que tiene un pKa mayor que el del ácido láctico, 4.75 y 3.86, respectivamente. Esto se debe a que una mayor proporción del ácido acético se encuentra en su forma no disociada y, por lo tanto puede penetrar la célula de los microorganismos (Guimarães *et al.*, 2018b).

6.13. Validación *in vivo* del efecto antifúngico empleando granos de cacao

Este tipo de pruebas de confrontación que estudian la capacidad inhibitoria de las cepas con actividad antifúngica en modelos alimentarios o alimentos contra cepas fúngicas contaminantes son necesarias por que complementan la información generada por las pruebas controladas *in vitro*. Los cultivos de los microorganismos con actividad antifúngica pueden comportarse de manera diferente en los ensayos realizados en medios sólidos o líquidos, las cuales son realizadas en las condiciones óptimas del cultivo que en los alimentos o modelos alimentarios, debido a que no se tienen condiciones óptimas o existe competencia con otros microorganismos presentes en la microbiota de la matriz alimentaria (Schwenninger *et al.*, 2011). Se han realizado este tipo de pruebas en diferentes modelos alimenticios como el pan (Gerez *et al.*, 2009; Axel *et al.*, 2015; Le Lay *et al.*, 2016; Saladino *et al.*, 2016; Russo *et al.*, 2017; Luz *et al.*, 2019; Ouidir *et al.*, 2019; Sadeghi *et al.*, 2019; Purabdolah *et al.*, 2020), productos lácteos (Cheong *et*

al., 2014; Aunbjerg *et al.*, 2015; Fernandez *et al.*, 2017; Lačanin *et al.*, 2017; Buehler *et al.*, 2018; Ouiddir *et al.*, 2019), productos vegetales (Sathe *et al.*, 2007), frutas (Ma *et al.*, 2019) y cacao (Romanens *et al.*, 2019).

Para realizar esta prueba se utilizó la metodología propuesta por Romanens *et al.* (2019), los resultados se muestran en la Tabla 6.13, en la cual se observó que la cepa de BAL *Lb. plantarum* 2 (BAL 4) presentó un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las tres especies de *Aspergillus*, mostrando además que fue la única que tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. flavus* (ver tabla 6.13), en estas condiciones. Las demás cepas de *Lb. plantarum* estudiadas solo tuvieron un efecto inhibitorio en el desarrollo de *A. ochraceus* y *A. carbonarius*, mientras que la cepa de *Lb. fermentum* solo mostró inhibir el crecimiento de *A. ochraceus*.

En el estudio de Romanens *et al.* (2019) se encontraron dos cepas de *Lb. fermentum* que presentaron un efecto inhibidor del crecimiento de *Penicillium citrinum*, cepa productora de la citrina y de *Gibberella moniliformis* S003, cepa productora de fumonisina, en la superficie del cacao. Además, las dos cepas de *Lb. fermentum* fueron utilizadas para formular un co-cultivo con *S. cerevisiae* y *H. opuntiae*, que fue probado para inhibir el crecimiento de *A. flavus*, cepa productora de aflatoxinas. Este co-cultivo inhibió el crecimiento del hongo en un 100% durante 14 días. Por lo cual, los autores señalan que se pueden emplear estos co-cultivos para limitar el crecimiento de hongos filamentosos durante el proceso de fermentación del cacao.

Por otro lado, en trabajos previos se ha encontrado que existe una baja presencia de especies del género *Aspergillus* durante la fermentación del cacao (Champion-Martínez, 2017; Hernández-Medina, 2018), esto puede deberse a la presencia de bacterias ácido-lácticas con potencial antifúngico como *Lb. plantarum*, *Lb. brevis*, y *Lb. fermentum*, las cuales tienen un efecto inhibitorio en el desarrollo de algunos hongos (Champion-Martínez, 2016).

TABLA 6.13 Efecto *in vivo* del efecto antifúngico de las BAL en los granos de cacao fermentados

	<i>A. flavus</i>	<i>A. carbonarius</i>	<i>A. ochraceus</i>
<i>Lb. plantarum</i> 1			
<i>Lb. fermentum</i>			
<i>Lb. plantarum</i> 2			
<i>Lb. plantarum</i> 3			
<i>Lb. plantarum</i> 4			

7. CONCLUSIONES

- Durante la fermentación del cacao se lograron aislar doce bacterias de la fermentación del cacao, de las cuales nueve son bacterias ácido-lácticas y posteriormente identificadas por pruebas bioquímicas como *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* y *Leuc. mesenteroides*.
- Los cultivos celulares y los extractos libres de células de *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum*, *Lb. brevis* y *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris* mostraron tener un efecto inhibitor en el crecimiento de las tres especies fúngicas estudiadas *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*.
- La actividad antifúngica ejercida por los extractos libres de células de las BAL en el crecimiento de *A. ochraceus* fue significativamente mayor que la encontrada para *A. flavus* y *A. carbonarius*, por lo cual *A. ochraceus* fue más susceptible al efecto de los extractos libres de células de las BAL evaluadas a las condiciones planteadas en el presente trabajo.
- El efecto antifúngico de los extractos libres de células de las cepas de *Lb. plantarum* se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos (láctico, acético, succínico y 3-fenil-láctico) mientras que en el caso del extracto libre de células de *Lb. fermentum* el efecto principal se debe a la producción de compuestos de otra naturaleza como ácidos grasos hidroxilados o compuestos orgánicos volátiles. La producción de peróxido de hidrógeno y compuestos de naturaleza proteica no presento relación con la actividad antifúngica de los extractos libres de células de las BAL analizadas en este trabajo a las condiciones evaluadas.
- La cepa de *Lb. plantarum* (BAL 4) tuvo un mayor potencial en las pruebas *in vivo* por lo que se concluye que esta bacteria puede ser utilizada como biocontrol en la cadena productiva del cacao.

8. RECOMENDACIONES Y PERSPECTIVAS

- Corroborar la identificación bioquímica de las cepas de bacterias ácido-lácticas con técnicas moleculares de identificación microbiana.
- Cuantificar la concentración de compuestos aromáticos volátiles y/o ácidos grasos hidroxilados del extracto libre de células de *Lb. fermentum* para analizar a cuál de estos compuestos se debe su efecto antifúngico.
- Estudiar la naturaleza química de los compuestos con actividad antifúngica de los extractos libres de células de *Lb. brevis* y *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*, una vez determinada realizar la cuantificación de éstos por las técnicas analíticas pertinentes.
- Estudiar el potencial probiótico de las cepas de *Lb. plantarum*, *Lb. fermentum* y *Lb. brevis* para que pueden ser posteriormente utilizadas en cultivos iniciadores funcionales.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M. R. y Nicolaidis, L. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. *Food Control*. 8(5–6):227–239.
- Abesamis, A. 2019. 8 unbelievable facts about the \$103 billion chocolate industry - Insider. Consultado en Abril-2020. En <https://www.insider.com/chocolate-industry-facts-statistics-consumption-2019-11>.
- Adler, P., Bolten, C. J., Dohnt, K., Hansen, C. E. y Wittmann, C. 2013. Core fluxome and metafluxome of lactic acid bacteria under simulated cocoa pulp fermentation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18):5670–5681.
- Afoakwa, E. O., Paterson, A., Fowler, M. y Ryan, A. 2008. Flavor formation and character in cocoa and chocolate: a critical review. *Crit. Rev. Food Sci.* 48(9):840–857.
- Alfano, A., Perillo, F., Fusco, A., Savio, V., Corsaro, M.M., Donnarumma, G., Schiraldi, C. y Cimini, D. 2020. *Lactobacillus brevis* CD2: fermentation strategies and extracellular metabolites characterization. *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 1–13.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. y Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1 - Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control*. 17(6):454–461. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.02.006>.
- Arana-Sánchez, A., Segura-García, L.E., Kirchmayr, M., Orozco-Ávila, I., Lugo-Cervantes, E. y Gschaedler-Mathis, A. 2015. Identification of predominant yeasts associated with artisan Mexican cocoa fermentations using culture-dependent and culture-independent approaches. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 31(2):359–369.
- Arasu, M.V., Al-Dhabi, N. A., Rejiniemon, T. S., Lee, K. D., Huxley, V. A. J., Kim, D.H., Duraipandiyar, V., Karuppiyah, P. y Choi, K.C. 2014. Identification and characterization of *Lactobacillus brevis* P68 with antifungal, antioxidant and probiotic functional properties. *Indian J. Microbiol.* 55(1):19–28.
- Ardhana, M.M. y Fleet, G.H. 2003. The microbial ecology of cocoa bean fermentations in Indonesia. *Int. J. Food Microbiol.* 86(1):87–99.
- Armaforte, E., Carri, S., Ferri, G. y Caboni, M. F. 2006. High-performance liquid chromatography determination of phenyllactic acid in MRS broth. *J. Chromatogr. A.* 1131(1–2): 281–284.
- Aryana, K.J. y Olson, D.W. 2017. A 100-year review: yogurt and other cultured dairy products. *J. Dairy Sci.* 100(12):9987–10013.

- Aunbjerg, S.D., Honoré, A.H., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F.K., Benfeldt, C., Skov, T. y Knøchel, S. 2015. Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *Int. J. Food Microbiol.* 194:46–53.
- Axel, C., Röcker, B., Brosnan, B., Zannini, E., Furey, A., Coffey, A. y Arendt, E.K. 2015. Application of *Lactobacillus amylovorus* DSM19280 in gluten-free sourdough bread to improve the microbial shelf life. *Food Microbiol.* 47:36–44.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. pp. 1-67. En: Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects, 3rd ed., (Ed Salminen, S., Wright, A.V. y Ouwehand, A.E.), CRC-Press., Boca Raton, Fla.
- Barletta, J., Estrada, T., Rolón, M.J., Erbin, M., Kaufman, S. y Pérez, H. 2017. Meningitis due to *Leuconostoc mesenteroides* associated with central nervous system tuberculosis: a case report. *Annals Clin. Case Rep.* 2: 1228.
- Batish, V. K., Grover, S. y Lal, R. 1989. Screening lactic starter cultures for antifungal activity. *Cult. Dairy Prod. J.* 24:23–25.
- Bazukyan, I., Matevosyan, L., Toplaghaltsyan, A. y Trchounian, A. 2018. Antifungal activity of lactobacilli isolated from Armenian dairy products: an effective strain and its probable nature. *AMB Express.* 8(1):87.
- Ben Taheur, F., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y.M.A., Ben Salah-Abbès, J. y Chaieb, K. 2019. Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon.* 160:12–22.
- Bennett, J. W. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(3): 497–516.
- Bergsson, G., Arnfinnsson, J., Steingrímsson, Ó. y Thormar, H. 2001. *In vitro* killing of *Candida albicans* by fatty acids and monoglycerides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(11):3209–3212.
- Bian, X., Muhammad, Z., Evivie, S.E., Luo, G.W., Xu, M. y Huo, G.C. 2016. Screening of antifungal potentials of *Lactobacillus helveticus* KLDS 1.8701 against spoilage microorganism and their effects on physicochemical properties and shelf life of fermented soybean milk during preservation. *Food Control.* 66:183–189.
- Bianchini, A. y Bullerman, L.B. 2009. Biological control of molds and mycotoxins in foods. pp. 1–16. En: ACS Symposium Series, 1st ed., (Ed. Apell, M., Kendra, D.F. y Trucksess, M.W.), American Chemical Society, Washington, D.C.
- Bisen, S. P. 2014. Microbiology. pp. 663-771. En: Laboratory protocols in Applied Life Sciences, 1st ed., (Ed. Bisen, S.P.), CRC, Taylor & Francis Group, LLC, US.
- Boone, D. R., Castenholz, R. W. y Garrity, G. M. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. Springer, New York, pp. 625-637.

- Bou, G., Saleta, J.L., Nieto, J. A.S., Tomás, M., Valdezate, S., Sousa, D., Lueiro, F., Villanueva, R., Pereira, M. J. y Llinares, P. 2008. Nosocomial outbreaks caused by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*. *Emerg. Infect Dis.* 14(6):968–971.
- Brul, S. y Coote, P. 1999. Preservative agents in foods: mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 50(1–2):1–17.
- Buehler, A.J., Martin, N.H., Boor, K.J. y Wiedmann, M. 2018. Evaluation of biopreservatives in Greek yogurt to inhibit yeast and mold spoilage and development of a yogurt spoilage predictive model. *J. Dairy Sci.* 101(12): 10759–10774.
- Bustos, A.Y., Font de Valdez, G. y Gerez, C.L. 2018. Optimization of phenyllactic acid production by *Pediococcus acidilactici* CRL 1753. Application of the formulated bio-preserver culture in bread. *Biol. Control.* 123:137–143.
- Camu, N., De Winter, T., Addo, S.K., Takrama, J.S., Bernaert, H. y De Vuyst, L. 2008a. Fermentation of cocoa beans: Influence of microbial activities and polyphenol concentrations on the flavour of chocolate. *J. Sci. Food Agric.* 88(13):2288–2297. <https://doi.org/10.1002/jsfa.3349>.
- Camu, N., De Winter, T., Verbrugghe, K., Cleenwerck, I., Vandamme, P., Takrama, J. S., Vancanneyt, M. y De Vuyst, L. 2007. Dynamics and biodiversity of populations of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria involved in spontaneous heap fermentation of cocoa beans in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 73(6):1809–1824. <https://doi.org/10.1128/aem.02189-06>.
- Camu, N., González, A., De Winter, T., Van Schoor, A., De Bruyne, K., Vandamme, P., Addo, S.K. y De Vuyst, L. 2008b. Influence of turning and environmental contamination on the dynamics of populations of lactic acid and acetic acid bacteria involved in spontaneous cocoa bean heap fermentation in Ghana. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(1): 86–98.
- Carlile, M. J., Watkinson, S. C. y Gooday, G. 2001. The Fungi 2nd. Ed. Academic Press, Londres, pp. 1-79.
- Champion-Martínez, E. 2017. Estudio de la dinámica de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos filamentosos) que influyen en la contaminación del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) con Ocratoxina A (OTA). Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- Cheong, E.Y.L., Sandhu, A., Jayabalan, J., Kieu Le, T.T., Nhiep, N.T., My Ho, H.T., Zwielerhner, J., Bansal, N. y Turner, M.S. 2014. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. *Food Control.* 46:91–97.

- Cicotello, J., Wolf, I.V., D'Angelo, L., Guglielmotti, D.M., Quiberoni, A. y Suárez, V.B. 2018. Response of *Leuconostoc* strains against technological stress factors: growth performance and volatile profiles. *Food Microbiol.* 73:362–370.
- Cleenwerck, I., Gonzalez, A., Camu, N., Engelbeen, K., De Vos, P. y De Vuyst, L. 2008. *Acetobacter fabarum* sp. nov., an acetic acid bacterium from a Ghanaian cocoa bean heap fermentation. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58(9): 2180–2185.
- Coda, R., Cassone, A., Rizzello, C. G., Nionelli, L., Cardinali, G. y Gobbetti, M. 2011. Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(10):3484–3492.
- Coeuret, V., Dubernet, S., Bernardeau, M., Gueguen, M. y Vernoux, J. 2003. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait.* 83(4):269–306.
- Coloretti, F., Carri, S., Armaforte, E., Chiavari, C., Grazia, L. y Zambonelli, C. 2007. Antifungal activity of lactobacilli isolated from salami. *FEMS Microbiol. Lett.* 271(2):245–250. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00723.x>.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T. y Taniwaki, M.H. 2013. Fungi and Mycotoxin Occurrence in Cocoa. pp. 61-71. En: Chocolate in Health and Nutrition, 1st. (Ed. Watson, R., Preedy, V.R. y Zibadi, S.) Humana Press, New York, N.Y. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-803-0_5.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Mororó, R.C., Pereira, J.L., Frisvad, J.C. y Taniwaki, M.H. 2012. The effect of cocoa fermentation and weak organic acids on growth and ochratoxin A production by *Aspergillus* species. *Int. J. Food Microbiol.* 155(3):158–164.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pereira, J.L., Fungaro, M.H. y Taniwaki, M.H. 2011. Aflatoxigenic fungi and aflatoxin in cocoa. *Int. J. Food Microbiol.* 148(2):141–144.
- Copetti, M.V., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I. y Taniwaki, M.H. 2014. Fungi and mycotoxins in cocoa: From farm to chocolate. *Int. J. Food Microbiol.* 178: 13–20.
- Copetti, M.V., Pereira, J.L., Iamanaka, B.T., Pitt, J.I. y Taniwaki, M.H. 2010. Ochratoxigenic fungi and ochratoxin A in cocoa during farm processing. *Int. J. Food Microbiol.* 143(1–2):67–70.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. y Damiani, P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50(2): 253–256.
- Cortés-Zavaleta, O., López-Malo, A., Hernández-Mendoza, A. y García, H.S. 2014. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. *Int. J. Food Microbiol.* 173:30–35.

- Cowan, S.T. 1993. Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3rd. Ed. Cambridge University Press, Cambridge, pp 50-93.
- Crowley, S., Mahony, J., y Van Sinderen, D. 2013a. Current perspectives on antifungal lactic acid bacteria as natural bio-preservatives. *Trends Food Sci. Technol.* 33(2):93–109.
- Crowley, S., Mahony, J., y Van Sinderen, D. 2013b. Broad-spectrum antifungal-producing lactic acid bacteria and their application in fruit models. *Folia Microbiol.* 58(4): 291–299.
- Dal Bello, F., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Ström, K., Sjögren, J., Van Sinderen, D., Schnürer, J. y Arendt, E.K. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. *J. Cereal Sci.* 45(3):309–318.
- Dalie, D., Deschamps, A., Richard-Forget, F., Lazzaroni, S. y Corsetti, A. 2010. Lactic acid bacteria - potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control.* 21(4):370–380.
- Daniel, H.M., Vrancken, G., Takrama, J.F., Camu, N., De Vos, P. y De Vuyst, L. 2009. Yeast diversity of Ghanaian cocoa bean heap fermentations. *FEMS Yeast Res.* 9(5):774–783.
- De Freire Bastos, M.C. y Ceotto, H. 2011. Bacterial Antimicrobial peptides and food preservation. pp. 62–76. En: Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality, 1st ed., (Ed. Rai, M. y Chikindas, M.), CAB International, London, UK.
- De Vuyst, L. y Weckx, S. 2015. The functional role of lactic acid bacteria in cocoa bean fermentation. pp. 248–278. En: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria, 2nd ed., (Ed. Mozzi, F., Raya, R. y Vignolo, G.M.), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, U.K.
- De Vuyst, L. y Weckx, S. 2016. The cocoa bean fermentation process: from ecosystem analysis to starter culture development. *J. Appl. Microbiol.* 121(1): 5–17.
- Digaitiene, A., Hansen, A.S., Juodeikiene, G., Eidukonyte, D. y Josephsen, J. 2012. Lactic acid bacteria isolated from rye sourdoughs produce bacteriocin-like inhibitory substances active against *Bacillus subtilis* and fungi. *J. Appl. Microbiol.* 112(4):732–742.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Lakhal Mirleau, F., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A. y Roussos, S. 2011. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp. as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe.* 17(6):267–272.
- El Khoury, A.E. y Atoui, A. 2010. Ochratoxin a: General overview and actual molecular status. *Toxins.* 2(4):461–493.

- Endo, A., Futagawa-Endo, Y. y Dicks, L.M.T. 2011. Influence of carbohydrates on the isolation of lactic acid bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 110(4):1085–1092.
- Endo, A. y Dicks, L.M.T. 2014. Physiology of the LAB. pp. 13–31. En: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy, 1st ed., (Ed. Holzapfel W.H. y Wood J.B.), John Wiley & Sons, Ltd. New Jersey, N.J.
- Falguni, P., Shilpa, V. y Mann, B. 2010. Production of proteinaceous antifungal substances from *Lactobacillus brevis* NCDC 02. *Int. J. Dairy Technol.* 63(1):70–76.
- Fernandez, B., Vimont, A., Desfossés-Foucault, É., Daga, M., Arora, G. y Fliss, I. 2017. Antifungal activity of lactic and propionic acid bacteria and their potential as protective culture in cottage cheese. *Food Control.* 78, 350–356.
- Figueroa-Hernández, C., Mota-Gutierrez, J., Ferrocino, I., Hernández-Estrada, Z.J., González-Ríos, O., Cocolin, L., y Suárez-Quiroz, M.L. 2019. The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 301:41–50.
- Fowler, M.S. 2009. Cocoa beans: From tree to factory. pp. 10–47. En: Industrial Chocolate Manufacture and Use, 4th ed., (Ed. Beckett, S.), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, U.K.
- Frisvad, J.C. y Samson, R.A. 2000. *Neopetromyces* gen. nov. and an overview of teleomorphs of *Aspergillus* subgenus *Circumdati*. *Stud. Mycol.* 45:201–208.
- García Díaz, S. 2013. Efecto de diferentes protocolos de mezclado en la fermentación de cacao sobre sus características físico-químicas y sensoriales. Tesis de Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz. Veracruz, México.
- García-Armisen, T., Papalexandratou, Z., Hendryckx, H., Camu, N., Vrancken, G., De Vuyst, L. y Cornelis, P. 2010. Diversity of the total bacterial community associated with Ghanaian and Brazilian cocoa bean fermentation samples as revealed by a 16S rRNA gene clone library. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(6):2281–2292.
- García-Quintans, N., Blancato, V., Repizo, G., Magni, C. y López, P. 2008. Citrate metabolism and aroma compound production in lactic acid bacteria. pp. 65–88. En: Molecular Aspects of Lactic Acid Bacteria for Traditional and New Applications, 1st ed., (Ed. Mayo, B., López, P. y Pérez-Martínez, G.), Research Signpost, Kerala, IN.
- Geiser, D.M. 2009. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Med. Mycol.* 47(1): S21-S26.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J. y Samson, R.A. 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 59:1–10.

- Gerez, C.L., Carbajo, M.S., Rollán, G., Torres Leal, G. y Font de Valdez, G. 2010. Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria. *J. Food Sci.* 75(6), M354–M359.
- Gerez, C.L., Torino, M.I., Rollán, G. y Font de Valdez, G. 2009. Prevention of bread mould spoilage by using lactic acid bacteria with antifungal properties. *Food Control.* 20(2):144–148.
- Gerez, C.L., Torres, M.J., Font de Valdez, G. y Rollán, G. 2013. Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biol. Control.* 64(3):231–237.
- Gilmour, M. y Lindblom, M. 2008. Management of ochratoxin A in the cocoa supply chain: a summary of work by the CAOBISCO/ECA/FCC working group on ochratoxin A. pp. 231–243. En: Mycotoxins: Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade, 1st ed., (Ed. Leslie, J.F., Bandyopadhyay, R y Visconti, A.), CAB International, London, U.K.
- Guimarães, A., Santiago, A., Teixeira, J. A., Venâncio, A. y Abrunhosa, L. 2018a. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. *Int. J. Food Microbiol.* 264:31–38.
- Guimarães, A., Venancio, A. y Abrunhosa, L. 2018b. Antifungal effect of organic acids from lactic acid bacteria on *Penicillium nordicum*. *Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess.* 35(9):1803–1818.
- Gutiérrez-Méndez, N., Rodríguez-Figueroa, J.C., González-Córdova, A.F., Nevárez-Moorillón, G.V., Rivera-Chavira, B. y Vallejo-Cordoba, B. 2010. Phenotypic and genotypic characteristics of *Lactococcus lactis* strains isolated from different ecosystems. *Can. J. Microbiol.* 56(5):432–439.
- Gutiérrez, T.J. 2017. State-of-the-art chocolate manufacture: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 16:1313–1344.
- Hassan, Y.I. y Bullerman, L.B. 2008. Antifungal activity of *Lactobacillus paracasei* ssp. *tolerans* isolated from a sourdough bread culture. *Int. J. Food Microbiol.* 121(1):112–115.
- Hedayati, M.T., Pasqualotto, A.C., Warn, P.A., Bowyer, P. y Denning, D.W. 2007. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology.* 153(6):1677–1692.
- Hemme, D. y Foucaud-Scheunemann, C. 2004. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. *Int. Dairy J.* 14(6):467–494.
- Hernández-Hernández, C., López-Andrade, P.A., Ramírez-Guillermo, M.A., Guerra Ramírez, D. y Caballero Pérez, J.F. 2016. Evaluation of different fermentation processes for use by small cocoa growers in Mexico. *Food Sci. Nutr.* 4(5):690–695.

- Hernández-Medina, S. 2018. Impacto de las vías de procesamiento postcosecha del grano de cacao (*Theobroma cacao* L.) sobre la contaminación por hongos toxigénicos. Tesis de maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz, México.
- Herráez, A. (2012). Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética: conceptos, técnicas y aplicaciones en ciencias de la salud 2nd Ed. Elsevier-España, S. L. Barcelona, pp 239-257.
- Hertzberger, R., Arents, J., Dekker, H.L., Pridmore, R.D., Gysler, C., Kleerebezem, M. y De Mattos, M.J.T. 2014. H₂O₂ production in species of the *Lactobacillus acidophilus* group: a central role for a novel NADH-dependent flavin reductase. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(7): 2229–2239.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. y De Vos, P. 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J. Microbiol. Methods.* 26(3):247–259.
- Ho, V.T.T., Zhao, J. y Fleet, G. 2015. The effect of lactic acid bacteria on cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 205:54–67.
- Holzappel, W. H., Franz, C.M.A.P., Ludwig, W. y Dicks, L.M.T. 2015. *Pediococcus*. pp. 1–15. En: Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria, 1st. (Ed. Whitman, W. B.), Wiley, New Jersey, US.
- Holzappel, W. y Wood, B. 2014. Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy 1st. Ed. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, pp. 1-55.
- Huh, C.K. y Hwang, T.Y. 2016. Identification of antifungal substances of *Lactobacillus sakei* subsp. ALI033 and antifungal activity against *Penicillium brevicompactum* strain FI02. *Prev. Nutr. Food Sci.* 21(1):52–56.
- Illegghems, K., De Vuyst, L., Papalexandratou, Z. y Weckx, S. 2012. Phylogenetic analysis of a spontaneous cocoa bean fermentation metagenome reveals new insights into its bacterial and fungal community diversity. *PLoS ONE.* 7(5):1–11.
- Ishiyama, K., Yamazaki, H., Senda, Y., Yamauchi, H. y Nakao, S. 2011. *Leuconostoc* bacteremia in three patients with malignancies. *J Infect Chemother.* 17(3):412–418.
- Jay, J. 2002. Microbiología moderna de los alimentos 4^{ta}. Ed. Acribia, Zaragoza, pp.157-256.
- Jespersen, L., Nielsen, D., Honholt, S. y Jakobsen, M. 2005. Occurrence and diversity of yeasts involved in fermentation of West African cocoa beans. *FEMS Yeast Res.* 5(4–5):441–453

- Khadidja, K., Halima, Z.K. y Nour-Eddine, K. 2018. Identification and major technological characteristics of *Lactococcus* and *Lactobacillus* strains isolated from hamoum, an Algerian fermented wheat. *Afr. J. Biotechnol.* 17(5): 108–117.
- Khalid, K. 2011. An overview of lactic acid bacteria. *Int. J. of Biosci.* 1(3):1-13.
- Klaenhammer, T.R., Barrangou, R., Buck, B.L., Azcarate-Peril, M.A. y Altermann, E. 2005. Genomic features of lactic acid bacteria effecting bioprocessing and health. *FEMS Microbiol. Rev.* 29(3):393–409
- König, H., y Fröhlich, J. 2017. Lactic acid bacteria. pp. 3–41. En: Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine, 1st ed., (Ed. König, H., Fröhlich, J. y Gottfried, U.), Springer-Verlag, Berlin.
- Kostinek, M., Ban-Koffi, L., Ottah-Atikpo, M., Teniola, D., Schillinger, U., Holzapfel, W.H. y Franz, C.M.A.P. 2008. Diversity of predominant lactic acid bacteria associated with cocoa fermentation in Nigeria. *Curr. Microbiol.* 56(4):306–314. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9097-9>.
- Kwak, M.K., Liu, R., Kim, M.K., Moon, D., Kim, A.H.J., Song, S.H. y Kang, S.O. 2014. Cyclic dipeptides from lactic acid bacteria inhibit the proliferation of pathogenic fungi. *J. Microbiol.* 52(1):64–70.
- Lačanin, I., Mounier, J., Pawtowski, A., Dušková, M., Kameník, J. y Karpíšková, R. 2017. Assessment of the antifungal activity of *Lactobacillus* and *Pediococcus* spp. for use as bioprotective cultures in dairy products. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 33(10):188.
- Lagunes- Gálvez, S., Loiseau, G., Paredes, J.L., Barel, M. y Guiraud, J.P. 2007. Study on the microflora and biochemistry of cocoa fermentation in the Dominican Republic. *Int. J. Food Microbiol.* 114(1):124–130.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. y Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(9):4084–4090.
- Lavermicocca, P., Valerio, F. y Visconti, A. 2003. Antifungal activity of phenyllactic acid against molds isolated from bakery products. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(1):634–640.
- Le Lay, C., Mounier, J., Vasseur, V., Weill, A., Le Blay, G., Barbier, G. y Coton, E. 2016. *In vitro* and *in situ* screening of lactic acid bacteria and propionibacteria antifungal activities against bakery product spoilage molds. *Food Control.* 60:247–255.
- Lee, S.H. y Chang, H.C. 2016. Isolation of antifungal activity of *Leuconostoc mesenteroides* TA from kimchi and characterization of its antifungal compounds. *Food Sci. Biotechnol.* 25(1):213–219.

- Lefeber, T., Janssens, M., Camu, N. y De Vuyst, L. 2010. Kinetic analysis of strains of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in cocoa pulp simulation media toward development of a starter culture for cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 76(23):7708–7716.
- Lefeber, Timothy, Gobert, W., Vrancken, G., Camu, N. y De Vuyst, L. 2011a. Dynamics and species diversity of communities of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria during spontaneous cocoa bean fermentation in vessels. *Food Microbiol.* 28(3):457–464.
- Lefeber, Timothy, Janssens, M., Moens, F., Gobert, W. y De Vuyst, L. 2011b. Interesting starter culture strains for controlled cocoa bean fermentation revealed by simulated cocoa pulp fermentations of cocoa-specific lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(18):6694–6698.
- Lefeber, Timothy, Papalexandratou, Z., Gobert, W., Camu, N. y De Vuyst, L. 2012. On-farm implementation of a starter culture for improved cocoa bean fermentation and its influence on the flavour of chocolates produced thereof. *Food Microbiol.* 30(2):379–392.
- Leyva-Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A. y Coton, E. 2017. Antifungal microbial agents for food biopreservation—a review. *Microorganisms.* 5(3):37.
- Li, H., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Uluko, H., Pang, X., Sun, Y., Xue, H., Zhao, L., Kong, F. y Lv, J. 2014. Antifungal activities and effect of *Lactobacillus casei* AST18 on the mycelia morphology and ultrastructure of *Penicillium chrysogenum*. *Food Control.* 43:57–64
- Lima, L.J.R., Almeida, M.H., Nout, M.J.R. y Zwietering, M.H. 2011. *Theobroma cacao* L., “The food of the gods”: quality determinants of commercial cocoa beans, with particular reference to the impact of fermentation. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51(8):731–761
- Lind, H., Sjögren, J., Gohil, S., Kenne, L., Schnürer, J. y Broberg, A. 2007. Antifungal compounds from cultures of dairy propionibacteria type strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 271(2):310–315.
- Luz, C., D’Opazo, V., Mañes, J. y Meca, G. 2019. Antifungal activity and shelf life extension of loaf bread produced with sourdough fermented by *Lactobacillus* strains. *J. Food Process Pres.* 43(10): e14126.
- Luz, C., Saladino, F., Luciano, F. B., Mañes, J. y Meca, G. 2017. *In vitro* antifungal activity of bioactive peptides produced by *Lactobacillus plantarum* against *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium expansum*. *LWT - Food Sci. Technol.* 81:128–135.

- Ma, J., Hong, Y., Deng, L., Yi, L. y Zeng, K. 2019. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum* on citrus. *Biol. Control*. 138:104044.
- Magnusson, J., Ström, K., Roos, S., Sjögren, J. y Schnürer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 219(1):129–135.
- Mani-López, E., García, H.S. y López-Malo, A. 2012. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. *Food Res. Int.* 45(2):713–721.
- Manini, F., Casiraghi, M.C., Poutanen, K., Brasca, M., Erba, D. y Plumed-Ferrer, C. 2016. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. *LWT - Food Sci. Technol.* 66:275–283.
- Marie, K.P., Ngoufack François, Z., Edith Marius, F.K., Ciobotaru, O., Matei, F., Cornea, C.P. y Israel-Roming, F. 2018. Antifungal activity of lactic acid bacteria isolated from peanuts, gari, and orange fruit juice against food aflatoxigenic molds. *Food Biotechnol.* 32(4):237–256.
- Marin, S., Ramos, A.J., Cano-Sancho, G. y Sanchis, V. 2013. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem. Toxicol.* 60:218–237.
- Matei, A., Cornea, C.P., Matei, S., Matei, G.M. y Rodino, S. 2015. Comparative antifungal effect of lactic acid bacteria strains on *Penicillium digitatum*. *Bull. Univ. Agric. Sci. Vet. Med. Cluj Napoca.* 72(2):226–230.
- Mattarelli, P., Holzapfel, W., Franz, C.M.A.P., Endo, A., Felis, G.E., Hammes, W., Pot, B., Dicks, L. y Dellaglio, F. 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64(4):1434–1451.
- Mauch, A., Dal Bello, F., Coffey, A. y Arendt, E.K. 2010. The use of *Lactobacillus brevis* PS1 to *in vitro* inhibit the outgrowth of *Fusarium culmorum* and other common *Fusarium* species found on barley. *Int. J. Food Microbiol.* 141(1–2):116–121.
- Mayo, B., Aleksandrak-Piekarczyk, A., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martín, P. y Bardowski, J. 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. pp. 3–33. En: Biotechnology of Lactic Acid Bacteria Novel Applications, 1st ed., (Ed. Mozzi, R., Raya, R.R., y Vignolo, G.M.), John Wiley & Sons. Ltd. New York, N.Y.
- Messens, W. y De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs - a review. *Int. J. Food Microbiol.* 72 (1):31–43.
- Miescher-Schwenninger, S., Freimüller Leischfeld, S. y Gantenbein-Demarchi, C. 2016. High-throughput identification of the microbial biodiversity of cocoa bean fermentation by MALDI-TOF MS. *Let. Appl. Microbiol.* 63(5), 347–355.

- Miles, A.A., Misra, S.S. y Irwin, J.O. 1938. The estimation of the bactericidal power of the blood. *J. Hygiene*. 38(6):732–749.
- Mobarez, A.M., Doust, R.H., Sattari, M. y Mantheghi, N. 2008. Antimicrobial effects of bacteriocin like substance produced by *L. acidophilus* from traditional yoghurt on *P. aeruginosa* and *S. aureus*. *J. Biol. Sci.* 8(1):221–224.
- Moens, F., Lefeber, T. y De Vuyst, L. 2014. Oxidation of metabolites highlights the microbial interactions and role of *Acetobacter pasteurianus* during cocoa bean fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 80(6):1848–1857.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Fontana-Tachon, A., Guyot, B., Tondje, P.R., y Guiraud, J.P. 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin a during cocoa processing in Cameroon. *Int. J. Food Microbiol.* 121(2):234–241.
- Mozzi, F. 2015. Lactic Acid Bacteria. pp. 501-508. En: Encyclopedia of Food and Health Vol. 3, 1st ed., (Ed. Caballero, B., Finglas, P.M. y Toldrá, F.), Academic Press, Oxford, UK
- Müller, T. 1990. Comparison of methods for differentiation between homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Zentralbl. Mikrobiol.* 145(5):363–366.
- Mu, W., Yu, S., Zhu, L., Zhang, T. y Jiang, B. 2012. Recent research on 3-phenyllactic acid, a broad-spectrum antimicrobial compound. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95(5):1155–1163.
- Muñoz, R., Moreno-Arribas, M. y De las Rivas, B. 2011. Lactic acid bacteria. pp. 227–255. En: Molecular Wine Microbiology, 1st ed., (Ed. Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R.), Elsevier, Amsterdam, NL.
- Ndagano, D., Lamoureux, T., Dortu, C., Vandermoten, S. y Thonart, P. 2011. Antifungal Activity of two lactic acid bacteria of the *Weissella* genus isolated from food. *J. Food Sci.* 76(6):M305–M311.
- Nielsen, D.S., Hønholt, S., Tano-Debrah, K. y Jespersen, L. 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast.* 22(4):271–284.
- Nielsen, D.S., Teniola, O.D., Ban-Koffi, L., Owusu, M., Andersson, T.S. y Holzapfel, W.H. 2007. The microbiology of Ghanaian cocoa fermentations analysed using culture-dependent and culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.* 114(2):168–186.
- Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. y Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.* 86(1):29–35.

- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C. y Samson, R.A. 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *Int. J. Food Microbiol.* 128(2):197–202.
- Ogier, J.C., Casalta, E., Farrokh, C. y Saihi, A. 2008. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Leuconostoc* genus. *Int. J. Food Microbiol.* 126(3):286–290.
- Orole, O. 2016. Ochratoxin A production by cocoa infested *Aspergillus* species in Ondo state, Nigeria. *Br. Biotechnol. J.* 12(2):1–7.
- Ouiddir, M., Bettache, G., Leyva Salas, M., Pawtowski, A., Donot, C., Brahimi, S., Mabrouk, K., Coton, E. y Mounier, J. 2019. Selection of Algerian lactic acid bacteria for use as antifungal bioprotective cultures and application in dairy and bakery products. *Food Microbiol.* 82:160–170.
- Ouattara, H. G., Koffi, B. L., Karou, G. T., Sangaré, A., Niamke, S. L. y Diopoh, J. K. 2008. Implication of *Bacillus* sp. in the production of pectinolytic enzymes during cocoa fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24(9):1753–1760.
- Ouwehand, A. C. y Vesterlung, S. 2004. Antimicrobial components from Lactic Acid Bacteria. pp. 375–396. En: Lactic Acid Bacteria- Microbiological and Functional Aspects, 3rd ed., (Ed. Salminen, S., von Wright, A. y Ouwehand, A.C.), Marcel Dekker, Inc. New York, N.Y.
- Özcelik, S., Kuley, E. y Özogul, F. 2016. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. *LWT - Food Sci. Technol.* 73: 536–542.
- Papalexandratou, Z., Falony, G., Romanens, E., Jimenez, J.C., Amores, F., Daniel, H.M. y De Vuyst, L. 2011a. Species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of the microbiota associated with traditional ecuadorian spontaneous cocoa bean fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.* 77(21):7698–7714.
- Papalexandratou, Z., Kaasik, K., Kauffmann, L.V., Skorstengaard, A., Bouillon, G., Espensen, J.L., Hansen, L.H., Jakobsen, R.R., Blennow, A., Krych, L., Castro-Mejía, J.L. y Nielsen, D.S. 2019. Linking cocoa varieties and microbial diversity of Nicaraguan fine cocoa bean fermentations and their impact on final cocoa quality appreciation. *Int. J. Food Microbiol.* 304: 106–118.
- Papalexandratou, Z., Lefeber, T., Bahrim, B., Lee, O.S., Daniel, H.M., y De Vuyst, L. 2013. *Hanseniaspora opuntiae*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum*, and *Acetobacter pasteurianus* predominate during well-performed Malaysian cocoa bean box fermentations, underlining the importance of these microbial species for a successful cocoa. *Food Microbiol.* 35(2):73–85.
- Papalexandratou, Z., Vrancken, G., De Bruyne, K., Vandamme, P. y De Vuyst, L. 2011b. Spontaneous organic cocoa bean box fermentations in Brazil are characterized by

- a restricted species diversity of lactic acid bacteria and acetic acid bacteria. *Food Microbiol.* 28(7):1326–1338.
- Patil, M.M., Pal, A., Anand, T. y Ramana, K.V. 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. *Indian J. Biotechnol.* 9(4):166–172.
- Perczak, A., Goliński, P., Bryła, M. y Waśkiewicz, A. 2018. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 69(1):32–45.
- Pereira, G.V. de M., Miguel, M.G. da C.P., Ramos, C.L. y Schwan, R.F. 2012. Microbiological and physicochemical characterization of small-scale cocoa fermentations and screening of yeast and bacterial strains to develop a defined starter culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 78(15):5395–5405.
- Porto, M.C.W., Kuniyoshi, T.M., Azevedo, P.O.S., Vitolo, M. y Oliveira, R.P.S. 2017. *Pediococcus* spp.: an important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. *Biotechnol. Adv.* 35(3):361–374.
- Prema, P., Smila, D., Palavesam, A. y Immanuel, G. 2010. Production and characterization of an antifungal compound (3-phenyllactic acid) produced by *Lactobacillus plantarum* strain. *Food Bioproc. Tech.* 3(3): 379–386.
- Purabdolah, H., Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Kashaninejad, M., Shahiri Tabarestani, H. y Mohamadzadeh, J. 2020. Techno-functional properties of the selected antifungal predominant LAB isolated from fermented acorn (*Quercus persica*). *J. Food Meas. Charact.* 14(3):1754–1764.
- Ramírez-Ramírez, J.C., Ulloa, P.R., Yanira, M., González, V., Ulloa, J.A. y Romero, F.A. 2011. Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente.* 2(7):1–16.
- Reiner, K. 2010. Catalase Test Protocol. pp. 1-9. American Society for Microbiology. www.asmscience.org.
- Reis, J.A., Paula, A.T., Casarotti, S.N. y Penna, A.L.B. 2012. Lactic acid bacteria antimicrobial compounds: characteristics and applications. *Food Eng. Rev.* 4(2):124–140
- Reverberi, M., Ricelli, A., Zjalic, S., Fabbri, A.A. y Fanelli, C. 2010. Natural functions of mycotoxins and control of their biosynthesis in fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87(3):899–911.
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. y Lonvaud, A. 2006. Lactic acid bacteria. pp. 115-137. En: Handbook of Enology: The Microbiology of Wine and Vinifications, Volume 1, 2nd., (Ed. Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Doneche, B. y Lonvaud, A.), John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, UK.

- Rizzello, C.G., Cassone, A., Coda, R. y Gobbetti, M. 2011. Antifungal activity of sourdough fermented wheat germ used as an ingredient for bread making. *Food Chem.* 127(3):952–959.
- Rojas-Ronquillo, R., Cruz-Guerrero, A., Flores-Nájera, A., Rodríguez-Serrano, G., Gómez-Ruiz, L., Reyes-Grajeda, J.P., Jiménez-Guzmán, J. y García-Garibay, M. 2012. Antithrombotic and angiotensin-converting enzyme inhibitory properties of peptides released from bovine casein by *Lactobacillus casei* Shirota. *Int. Dairy J.* 26:147–154.
- Rokas, A., Payne, G., Fedorova, N.D., Baker, S.E., Machida, M., Yu, J., Georgianna, R. D., Dean, R.A., Bhatnagar, D., Cleveland, T.E., Wortman, J.R., Maiti, R., Joardar, V., Amedeo, P., Denning, D.W. y Nierman, W.C. 2007. What can comparative genomics tell us about species concepts in the genus *Aspergillus*? *Stud. Mycol.* 59:11–17.
- Romanens, E., Freimüller Leischfeld, S., Volland, A., Stevens, M., Krähenmann, U., Isele, D., Fischer, B., Meile, L. y Miescher-Schwenninger, S. 2019. Screening of lactic acid bacteria and yeast strains to select adapted anti-fungal co-cultures for cocoa bean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 290:262–272.
- Ruas-Madiedo, P., Sánchez, B., Hidalgo-Cantabrana, C., Margolles, A. y Laws, A. 2012. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria and bifidobacteria. pp. 125-152. En: Handbook of Animal-based Fermented Food and Beverage Technology, 1st ed., (Ed. Hui Y. H. y Evranuz E.O.), CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Ruggirello, M., Nucera, D., Cannoni, M., Peraino, A., Rosso, F., Fontana, M., Cocolin, L. y Dolci, P. 2019. Antifungal activity of yeasts and lactic acid bacteria isolated from cocoa bean fermentations. *Food Res. Int.* 115:519–525.
- Russo, P., Fares, C., Longo, A., Spano, G. y Capozzi, V. 2017. *Lactobacillus plantarum* with broad antifungal activity as a protective starter culture for bread production. *Foods.* 6(12):110.
- Sabo, S.S., Converti, A., Ichiwaki, S. y Oliveira, R.P.S. 2019. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST16Pa in supplemented whey powder formulations. *J. Dairy Sci.* 102(1):87–99.
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Mortazavi, S.A. y Abedfar, A. 2019. Application of the selected antifungal LAB isolate as a protective starter culture in pan whole-wheat sourdough bread. *Food Control.* 95:298–307.
- Sadiq, F.A., Yan, B., Tian, F., Zhao, J., Zhang, H. y Chen, W. 2019. Lactic acid bacteria as antifungal and anti-mycotoxigenic agents: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18(5):1403–1436.
- Saladino, F., Luz, C., Manyes, L., Fernández-Franzón, M. y Meca, G. 2016. *In vitro* antifungal activity of lactic acid bacteria against mycotoxigenic fungi and their application in loaf bread shelf life improvement. *Food Control.* 67:273–277.

- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., y Varga, J. 2007. Diagnostic tools to identify black aspergilli. *Stud. Mycol.* 59:129–145.
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. y Frisvad, J.C. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 78(1):141–173.
- Sánchez-Hervás, M., Gil, J.V., Bisbal, F., Ramón, D. y Martínez-Culebras, P. V. 2008. Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *Int. J. Food Microbiol.* 125(3):336–340.
- Sandhya, M.V.S., Yallappa, B.S., Varadaraj, M.C., Puranaik, J., Rao, L.J., Janardhan, P. y Murthy, P.S. 2016. Inoculum of the starter consortia and interactive metabolic process in enhancing quality of cocoa bean (*Theobroma cacao*) fermentation. *LWT - Food Sci. Technol.* 65:731–738.
- Sathe, S.J., Nawani, N.N., Dhakephalkar, P.K. y Kapadnis, B.P. 2007. Antifungal lactic acid bacteria with potential to prolong shelf-life of fresh vegetables. *J. Appl. Microbiol.* 103(6):2622–2628.
- Savijoki, K., Ingmer, H. y Varmanen, P. 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71(4):394–406.
- Schwan, R. 1998. Cocoa fermentations conducted with a defined microbial cocktail inoculum. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(4):1477–1483.
- Schwan, R.F., De Melo Pereira, G.V. y Fleet, G.H. 2015. Microbial activities during cocoa fermentation. pp. 148-211. En: Cocoa and Coffee Fermentations, 1st ed., (Ed. Schwan R.F. y Fleet, G.H.), CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Schwan, R. y Wheals, A.E. 2004. The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44(4), 205–221.
- Schwenninger, S.M., Meile, L., y Lacroix, C. 2011. Antifungal lactic acid bacteria and propionibacteria for food biopreservation. pp. 27–62. En: Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation, 1st ed., (Ed. Lacroix, C.), Woodhead Publishing Limited, Oxford, UK.
- Sellamani, M., Kalagatur, N.K., Siddaiah, C., Mudili, V., Krishna, K., Natarajan, G. y Rao Putcha, V.L. (2016). Antifungal and zearalenone inhibitory activity of *Pediococcus pentosaceus* isolated from dairy products on *Fusarium graminearum*. *Front. Microbiol.* 7:890.
- Serra, R., Cabañes, F.J., Perrone, G., Castellá, G., Venâncio, A., Mulè, G. y Kozakiewicz, Z. 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia.* 98(2), 295–306.

- Sezer, C. y Güven, A. 2009. Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. *Kafkas Univ. Vet. Fak.* 15(1):63–69.
- Shehata, M.G., Badr, A.N., El Sohaimy, S.A., Asker, D. y Awad, T.S. 2019. Characterization of antifungal metabolites produced by novel lactic acid bacterium and their potential application as food biopreservatives. *Ann. Agric. Sci.* 64(1):71–78.
- Shephard, G.S. 2008. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* 37(11):2468–2477.
- Singh, S., Goswami, P., Singh, R. y Heller, K.J. 2009. Application of molecular identification tools for *Lactobacillus*, with a focus on discrimination between closely related species: a review. *LWT- Food Sci. Technol.* 42(2), 448–457.
- Sjögren, J., Magnusson, J., Broberg, A., Schnürer, J. y Kenne, L. 2003. Antifungal 3-hydroxy fatty acids from *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12):7554–7557.
- Stiles, M.E. y Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36(1):1–29.
- Ström, K., Sjögren, J., Broberg, A. y Schnürer, J. 2002. *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 produces the antifungal cyclic dipeptides cyclo(L-Phe-L-Pro) and cyclo(L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) and 3-phenyllactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(9):4322–4327.
- Suárez-Quiroz, M., Alonso Campos, A., Valerio Alfaro, G., González-Ríos, O., Villeneuve, P. y Figueroa-Espinoza, M.C. 2013. Anti-*Aspergillus* activity of green coffee 5-O-caffeoyl quinic acid and its alkyl esters. *Microb. Pathog.* 61–62, 51–56.
- Subramanian, C.V. 1972. The perfect states of *Aspergillus*. *Curr. Sci.* 41:755–761. <https://doi.org/10.2307/24077958>.
- Sumby, K.M., Grbin, P.R. y Jiranek, V. 2014. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:8111–8132.
- Tamang, J.P., Shin, D.H., Jung, S.J. y Chae, S.W. 2016. Functional properties of microorganisms in fermented foods. *Front. Microbiol.* 7: 578. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00578>.
- Thompson, S., Miller, K., López, A. y Camu N. 2013. Cocoa and coffee. pp. 881-889. En: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers 4th ed., (Ed. Doyle M.P. y R.L. Buchanan), ASM Press, Washington, D.C.
- Vandamme, P., De Bruyne, K. y Pot, Y. 2014. Phylogenetics and systematics. pp. 31-44. En: Lactic Acid Bacteria: Biodiversity and Taxonomy 1st ed., (Ed. Holzapfel, W.H. y Wood, B.J.), John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.

- Varsha, K.K., Devendra, L., Shilpa, G., Priya, S., Pandey, A. y Nampoothiri, K.M. 2015. 2,4-Di-tert-butyl phenol as the antifungal, antioxidant bioactive purified from a newly isolated *Lactococcus* sp. *Int. J. Food Microbiol.* 211:44–50.
- Varsha, K.K. y Nampoothiri, K.M. 2016. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. *Food Control.* 69:61–64.
- Verce, M., De Vuyst, L. y Weckx, S. 2020. Comparative genomics of *Lactobacillus fermentum* suggests a free-living lifestyle of this lactic acid bacterial species. *Food Microbiol.* 89:103448.
- Voulgari, K., Hatzikamari, M., Delepoglou, A., Georgakopoulos, P., Litopoulou-Tzanetaki, E. y Tzanetakis, N. 2010. Antifungal activity of non-starter lactic acid bacteria isolates from dairy products. *Food Control.* 21(2):136–142.
- Wacher R.M. 2011. Microorganismos y chocolate. *R. D. U.* 12(4), 1067–6079.
- Wang, H., Yan, Y., Wang, J., Zhang, H. y Qi, W. 2012. Production and characterization of antifungal compounds produced by *Lactobacillus plantarum* IMAU10014. *PLoS One.* 7(1): e29452.
- Wessels, S., Axelsson, L., Bech Hansen, E., De Vuyst, L., Laulund, S., Lähteenmäki, L., Lindgren, S., Mollet, B., Salminen, S. y von Wright, A. 2004. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci. Technol.* 15(10):498–505.
- Yang, E.J. y Chang, H.C. 2010. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol.* 139(1–2):56–63.
- Yang, E.J., Kim, Y.S. y Chang, H.C. 2011. Purification and characterization of antifungal δ -dodecalactone from *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *J. Food Prot.* 74(4): 651–657.
- Yépez, A., Luz, C., Meca, G., Vignolo, G., Mañes, J. y Aznar, R. 2017. Biopreservation potential of lactic acid bacteria from Andean fermented food of vegetal origin. *Food Control.* 78:393–400.
- Zhang, X., Zhang, S., Shi, Y., Shen, F. y Wang, H. 2014. A new high phenyl lactic acid-yielding *Lactobacillus plantarum* IMAU10124 and a comparative analysis of lactate dehydrogenase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 356(1):89–96. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12483>
- Zalán, Z., Hudáček, J., Štětina, J., Chumchalová, J. y Halász, A. 2010. Production of organic acids by *Lactobacillus* strains in three different media. *Eur. Food Res. Technol.* 230(3):395–404. <https://doi.org/10.1007/s00217-009-1179-9>.

10. APÉNDICES

10.1 Metodologías utilizadas para la caracterización morfológica y bioquímica de las BAL

10.1.1 Tinción de Gram

El frotis bacteriano fue cubierto por cristal violeta y el cual se dejó actuar por un minuto. El exceso del colorante fue lavado con agua. Posteriormente, el lugol se agregó cubriendo al frotis dejándolo actuar por un minuto. Se eliminó el lugol con agua. Posteriormente, se agregó solución de alcohol-cetona al 70% hasta la obtención de un efluente incoloro. Finalmente, el frotis fue cubierto con safranina, la cual se dejó actuar durante un minuto. El exceso de safranina fue eliminado con agua hasta que el frotis no presentó coloración. Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente y fueron observadas al microscopio empleando los objetivos de 10x, 40x y 100x.

10.1.2 Prueba de catalasa

Se colocó una gota de peróxido de hidrógeno al 3% en un portaobjetos, posteriormente utilizando un palo de madera estéril o con un asa de incubación, se tomó una pequeña cantidad del microorganismo a partir de una colonia aislada, cuidando de no tomarse agar. Si existió la formación de burbujas, el microorganismo se considera catalasa positivo.

10.1.3 Prueba de oxidasa

Con el asa de inoculación se tomó una asada de una colonia, la cual fue aplicada sobre la zona reactiva de la tira Bactiden Oxidasa® (Merck) y se frotó con el asa de inoculación. Al cabo de 60 segundos se comparó la tira reactiva con la escala colorimétrica de la prueba.

10.1.4 Pruebas de producción de dióxido de carbono (CO₂)

Primeramente, se realizó el acondicionamiento de las BAL en caldo MRS por 24 horas a una temperatura de 30°C. De este cultivo se tomó 1 mL, el cual fue ajustado con la escala de Mc Farland, para inocular los tubos de rosca que contenían 9 mL de MRS y una campana de Durham.

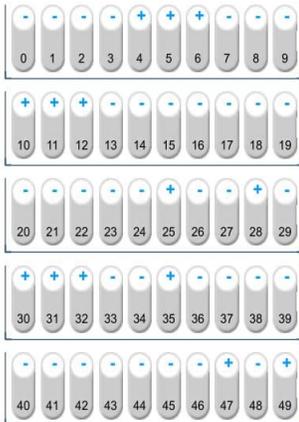
10.2.2 BAL 2 (*Lb. fermentum*)

25/9/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

APIWEB™

API 50 CHL V5.2



REFERENCIA BAL 2 FECHA 01/03/19

COMENTARIO
Producción de CO₂
Crecimiento a 2% de NaCl, temp 25-45°C

BUENA IDENTIFICACION	
Galería	API 50 CHL V5.2
Perfil	-----+-----++-----+-----+-----+-----++
Nota	

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus fermentum 2	98.4	0.98			
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra		
Lactobacillus brevis 2	0.8	0.7	ESC 23%	TRE 1%	

10.2.6 BAL 8 (*Leuc. mesenteroides*)

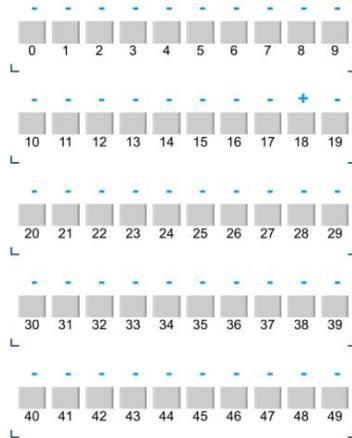
5/3/2019

apiweb™ - Resultado de identificación

Laboratorio de Bromatología - Veracruz, Veracruz



API 50 CHL V5.2



REFERENCIA BAL 8
FECHA 5/03/19
COMENTARIO

PERFIL DUDOSO

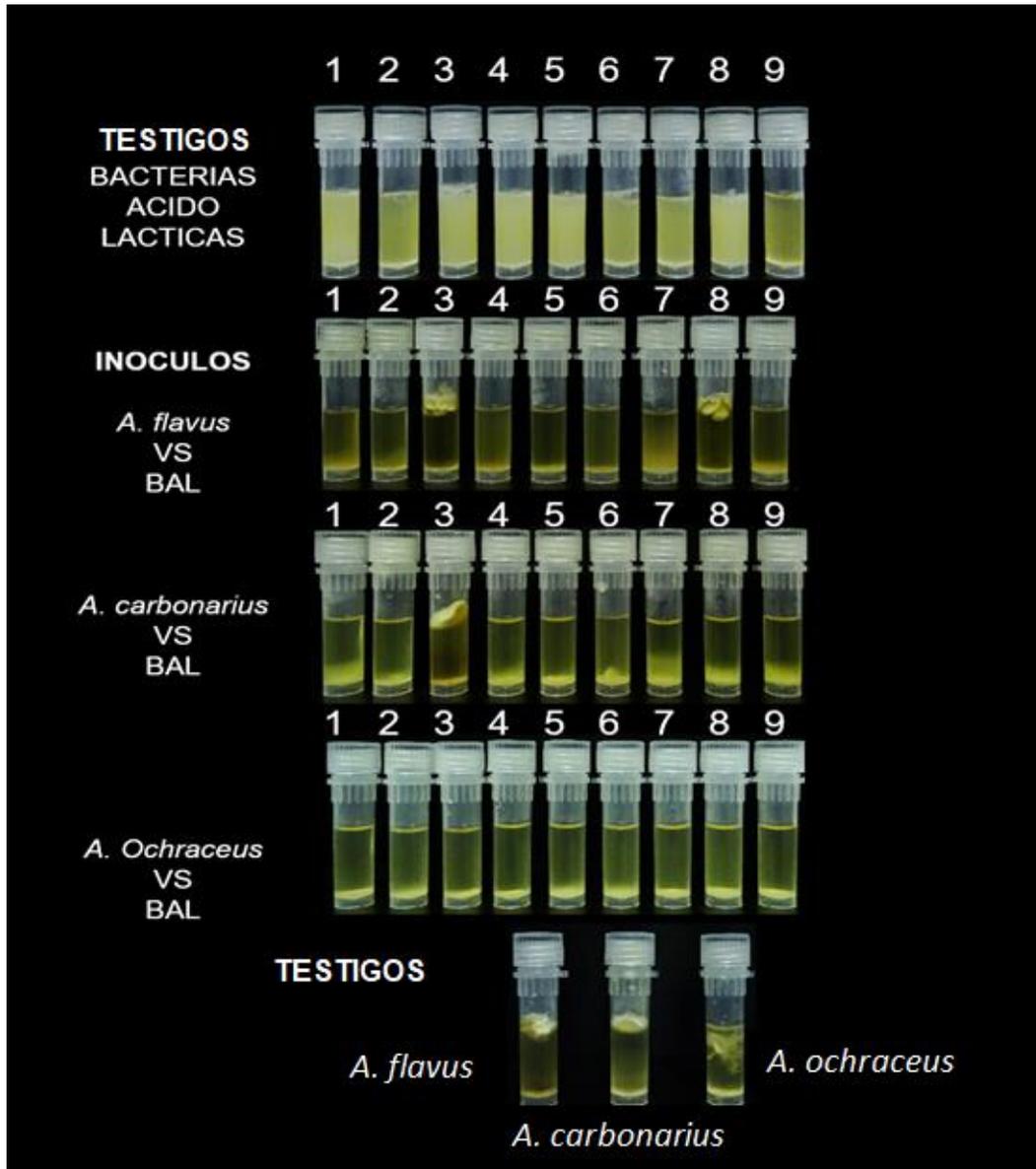
Galería API 50 CHL V5.2
Perfil -----+-----
Nota

Taxón significativo	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>cremoris</i>	86.9	0.42	GAL	90%	GLU	90%	MAN	0%	NAG	90%
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	11.0	0.32	GLU	100%	FRU	90%	MAN	0%	GNT	90%
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	1.7	0.24	GLU	98%	FRU	98%	MAN	0%	LAC	98%
Taxón siguiente	% ID	T	Pruebas en contra							
<i>Lactobacillus lindneri</i>	0.1	0.1	GLU	100%	FRU	100%	MAN	0%	MAL	100%
Pruebas complementarias(s)	GLUCOSAg	15°C	COCOS		45°C					
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp <i>bulgaricus</i>	-	-	-	-	+					
<i>Lactobacillus fructivorans</i>	+	-	-	-	-					
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>cremoris</i>	+	+	+	-	-					

Cerrar

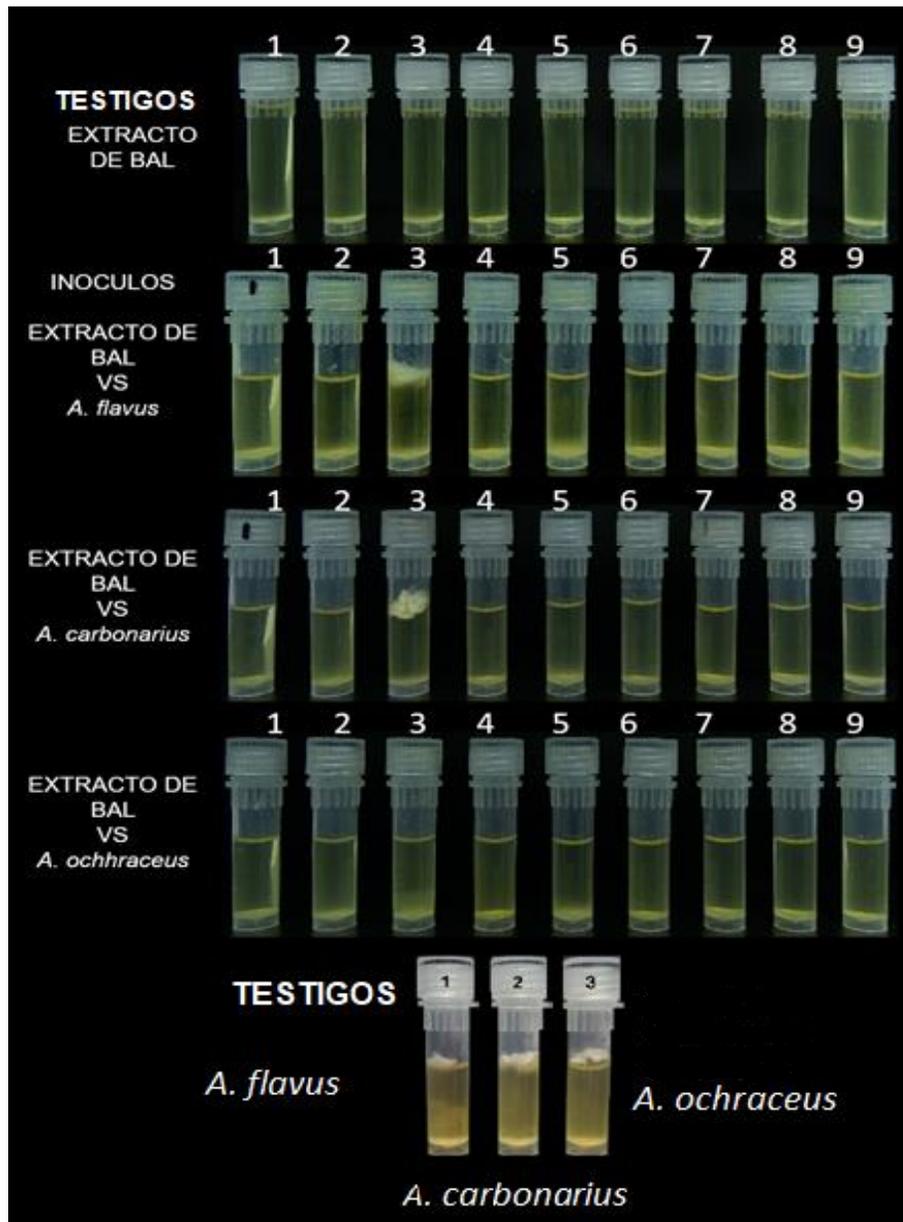
Imprimir

10.3 Resultados de la prueba de actividad antifúngica de los cultivos celulares de las BAL sobre la germinación de esporas de *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*



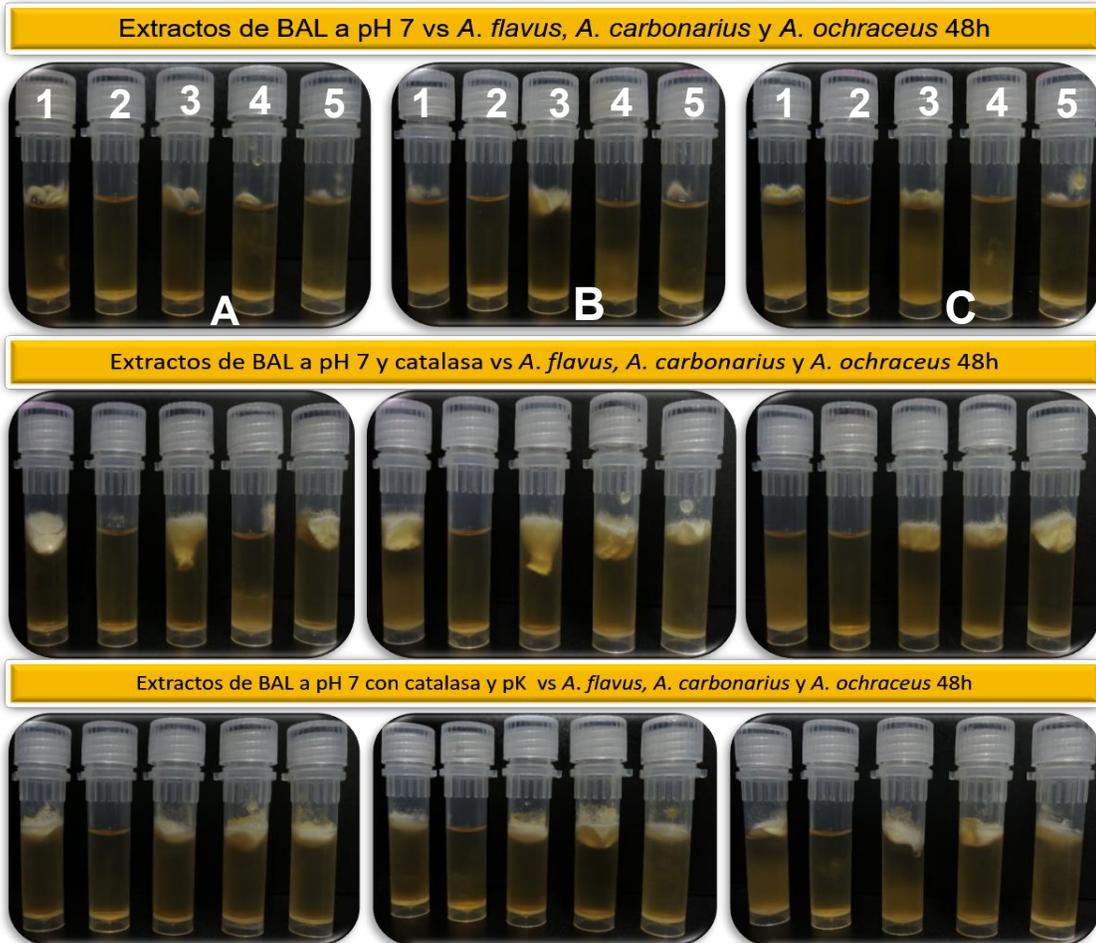
Los cultivos de BAL utilizados son: 1) *Lb. plantarum* 1, 2) *Lb. fermentum*, 3) BAL no identificada, 4) *Lb. plantarum* 2, 5 y 6) *Lb. brevis*, 7) *Lb. plantarum* 3, 8) *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*, 9) *Lb. plantarum* 4 y las cepas fúngicas son: 1) *A. flavus*, 2) *A. carbonarius* y 3) *A. ochraceus*.

10.4 Resultados de la prueba de actividad antifúngica de los extractos libres de células de BAL sobre la germinación de esporas de *A. flavus*, *A. carbonarius* y *A. ochraceus*



Los extractos libres de células de las BAL utilizados son: 1) *Lb. plantarum* 1, 2) *Lb. fermentum*, 3) BAL no identificada, 4) *Lb. plantarum* 2, 5 y 6) *Lb. brevis*, 7) *Lb. plantarum* 3, 8) *Leuc. mesenteroides* ssp. *cremoris*, 9) *Lb. plantarum* 4 y las cepas fúngicas son: 1) *A. flavus*, 2) *A. carbonarius* y 3) *A. ochraceus*.

10.5 Resultados de la prueba para la determinación de la naturaleza química de los compuestos con actividad antifúngica



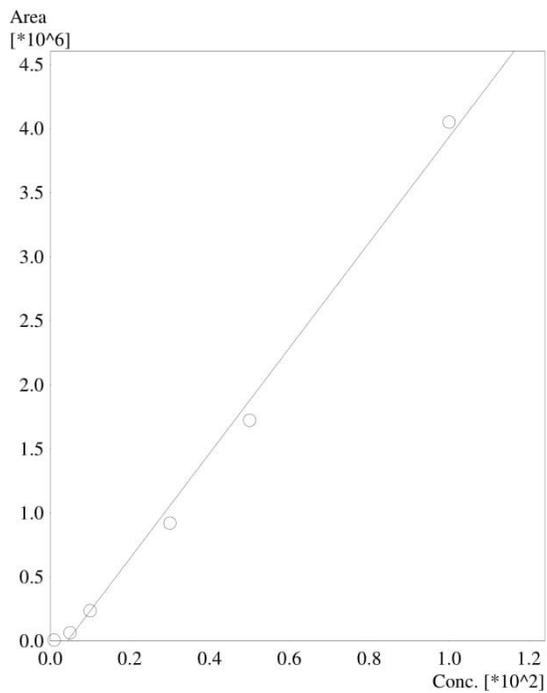
Los extractos libres de células de las BAL 1: *Lb. plantarum* 1 (BAL 1), 2: *Lb. fermentum* (BAL2), 3: *Lb. plantarum* 2 (BAL 4), 4: *Lb. plantarum* 3 (BAL 7) y *Lb. plantarum* 4 (BAL 9) y las tres cepas fúngicas A) *A. flavus*, B) *A. carbonarius* y C) *A. ochraceus*.

10.6 Curvas de calibración de los principales ácidos orgánicos encontrados en los extractos libres de células de las BAL aisladas del cacao

10.6.1 Curva de calibración del ácido láctico

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : lactico
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=41096.4*x-177454$
 Rr1=0.9967575 Rr2=0.9935255 RSS=7.840087e+010
 MeanRF: 2.461402e+004 RFSd: 1.317508e+004 RFRSD: 53.526714
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA

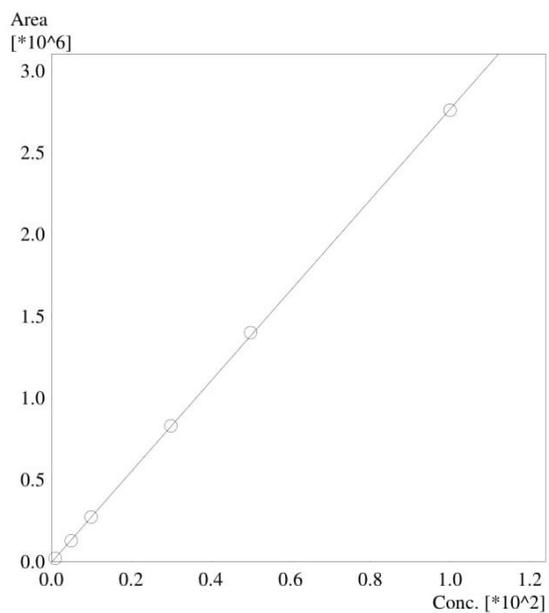


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	6286	6286
2	5	62541	62541
3	10	233747	233747
4	30	918611	918611
5	50	1720483	1720483
6	100	4048498	4048498

10.6.2 Curva de calibración del ácido acético

Calibration Curve

ID# : 1
 Name : acetico
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=27712.6*x-4201.63$
 Rr1=0.9999596 Rr2=0.9999192 RSS=4.422849e+008
 MeanRF: 2.618896e+004 RFSD: 2.539904e+003 RFRSD: 9.698374
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA

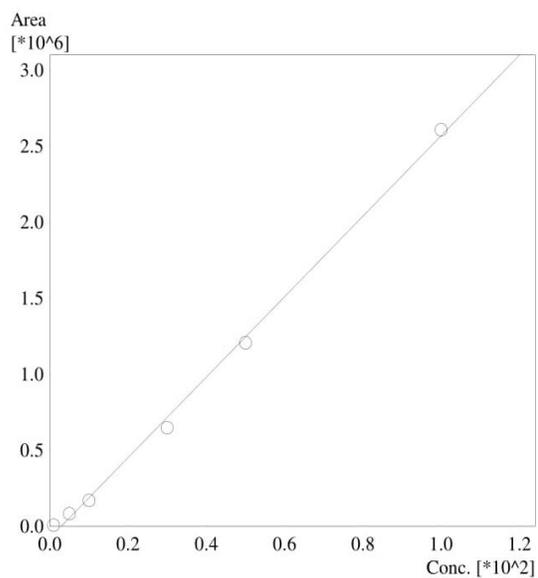


#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	21351	21351
2	5	127006	127006
3	10	271816	271816
4	30	829256	829256
5	50	1398770	1398770
6	100	2758270	2758270

10.6.3. Curva de calibración del ácido succínico

Calibration Curve

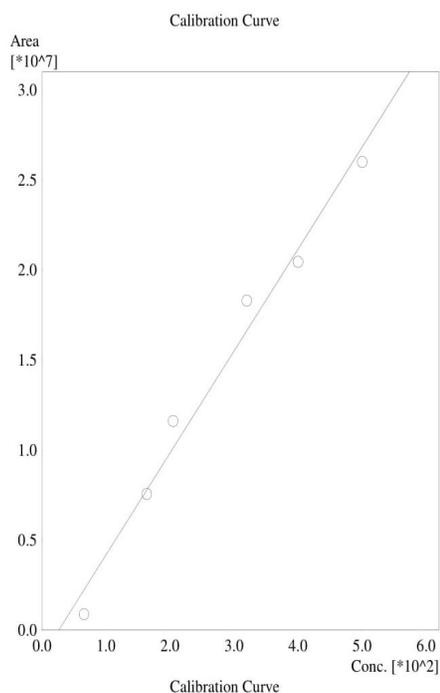
ID# : 1
 Name : succino
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x)=26452.9*x-77382.9$
 Rr1=0.9987966 Rr2=0.9975947 RSS=1.201810e+010
 MeanRF: 1.866896e+004 RFSD: 6.930398e+003 RFRSD: 37.122565
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	1	6905	6905
2	5	81881	81881
3	10	169045	169045
4	30	648700	648700
5	50	1206530	1206530
6	100	2607400	2607400

10.6.4. Curva de calibración del ácido 3-fenil-acético

ID# : 1
 Name : ac. fenilactico
 Quantitative Method : External Standard
 Function : $f(x) = 56625.0 * x - 1.48970e+006$
 $Rr1 = 0.9904211$ $Rr2 = 0.9809340$ $RSS = 8.066343e+012$
 MeanRF: 4.880584e+004 RFSD: 1.316938e+004 RFRSD: 26.983211
 FitType : Linear
 ZeroThrough : Not Through
 Weighted Regression : None
 Detector Name : PDA



#	Conc.(Ratio)	MeanArea	Area
1	65.536	873958	873958
2	163.84	7547775	7521133
			7574417
3	204.8	11597002	11717319
			11476685
5	320	18288337	18374212
			18202462
6	400	20437823	20437823
7	500	25984571	26043064
			25926079