



**Actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos de
fermentación artesanal**

Sol Daniela Zuluaga-Valencia.; Ana María Restrepo-Villa.

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología Industrial y Ambiental
Medellín
2022



Actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos de fermentación artesanal

Sol Daniela Zuluaga-Valencia.; Ana María Restrepo-Villa.

Asesor(es)

Yuli Stephany López-Cadena. M.Sc.; Francia Elena Valencia-García. Ph.D.;
Natalia Restrepo Ochoa. Ph.D.

Universidad de Antioquia
Escuela de Microbiología
Microbiología Industrial y Ambiental
Medellín
2022

Agradecimientos

Este es un proyecto estratégico de cooperación internacional aprobado por el Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo (CYTED) y financiado por Ministerio de ciencia, tecnología e innovación de Colombia (MinCiencias), contrato 304 de 2018; el contrato de acceso a recursos genéticos y subproductos derivados No 0126 del 13 de mayo de 2016; expediente RGE156-8 de Ministerio de Ambiente y Desarrollo de Colombia (MinAmbiente), y fue presentado anteriormente en el VI simposio internacional agroalimentario (Sial 2019), Montería -Córdoba, Colombia, Octubre 2019.

Actividad antifúngica de bacterias ácido lácticas aisladas de alimentos de fermentación artesanal

Resumen

El deterioro de alimentos por hongos ha sido tema de preocupación debido a las pérdidas para la industria alimentaria y el riesgo para la salud del consumidor asociado a la producción de micotoxinas. Una de las alternativas con mayor potencial para resolver esta problemática ha sido el uso de bacterias ácido lácticas (BAL), las cuales pueden inhibir el crecimiento fúngico a través de la producción de compuestos orgánicos. En este estudio se determinó la actividad antifúngica de 29 sobrenadantes de BAL aisladas de alimentos fermentados artesanalmente mediante la técnica de dilución en agar, donde se obtuvo que *Penicillium* sp. fue más sensible a los compuestos producidos por las BAL con una CMI ≥ 50 % v/v de sobrenadante comparado con *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* con una CMI > 70 % v/v de sobrenadante. Asimismo, se evidenció mayor capacidad antifúngica en el género *Lactobacillus* asociada a la producción de ácidos orgánicos y la disminución del pH. Los resultados obtenidos sugieren el potencial de las BAL como aditivos conservantes de origen natural.

Palabras clave: actividad antifúngica, alimentos fermentados, bacterias ácido lácticas, control de alimentos, bioprotector, *Lactobacillus*.

Tabla de Contenido

1. Introducción	6
2. Objetivos.....	8
2.1. Objetivo general	8
2.2. Objetivos específicos.....	8
3. Metodología.....	8
3.1. Microorganismos empleados.....	8
3.2. Acondicionamiento de las cepas	8
3.3. Determinación de la actividad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos de BAL	9
3.4. Caracterización preliminar de los sobrenadantes obtenidos de BAL	9
4. Resultados y discusión	10
5. Conclusión	13
6. Referencias Bibliográficas	14
7. Anexos.....	17

1. Introducción

Desde la producción primaria hasta el consumo final de los alimentos, la calidad y la vida útil de los productos pueden reducirse, debido a los cambios indeseables causados por agentes químicos, físicos y biológicos a los que pueden estar sometidos. Dentro de los agentes biológicos se incluye la acción de enzimas y la contaminación por microorganismos, siendo uno de los factores de mayor preocupación. Se estima que el deterioro debido únicamente a los microorganismos provoca la pérdida de casi una cuarta parte del suministro de alimentos del mundo, además de las pérdidas económicas y los riesgos para la salud del consumidor debido a la posible presencia de toxinas o microorganismos patógenos (Ahmad Azad et al., 2019).

Los hongos son algunos de los microorganismos de deterioro más resistentes, capaces de superar las estrategias de control utilizadas por la industria alimentaria, dado a que poseen características estructurales y mecanismos de supervivencia particulares, que les permite una mayor dispersión y contaminación cruzada dentro de la infraestructura de procesamiento de alimentos (A. B. Snyder et al., 2019). Estos microorganismos pueden comportarse como oportunistas en la contaminación de alimentos con baja actividad de agua, en ambientes saturados de cloruro de sodio (NaCl), en un amplio intervalo de temperatura y bajas concentraciones de oxígeno y valores de pH (A. B. Snyder et al., 2019; A. Snyder & Worobo, 2018).

Se han informado especies de *Penicillium* y *Aspergillus* como principales organismos de deterioro durante el procesamiento y almacenamiento de una gran variedad de alimentos, además corresponden a los géneros más estudiados respecto a la intoxicación alimentaria (Rico-Munoz et al., 2019). Esto puede considerarse un problema de seguridad alimentaria debido a la producción de micotoxinas o alérgenos, principalmente aflatoxinas producidas por especies de *Aspergillus* y la producción de compuestos tóxicos como citrina y citreoviridina por *Penicillium* sp. (Olalekan Adeyeye, 2020). La contaminación por micotoxinas puede darse en diferentes condiciones ambientales, además son de naturaleza resistiva debido a su estabilidad química y térmica, permaneciendo en el alimento durante su procesamiento. Es así como los hongos productores de micotoxinas se encuentran entre los contaminantes de alimentos que deben ser controlados (Zhou & Tang, 2020).

Si bien, la industria alimentaria ha implementado diversas técnicas para prevenir el crecimiento y deterioro por hongos patógenos, en muchos casos los métodos convencionales químicos y físicos son poco prácticos o ineficaces (Ribes et al., 2017). En consecuencia, actualmente se ha aumentado el interés por nuevas alternativas para proteger los productos alimenticios mediante la sustitución de agentes sintéticos por compuestos naturales, respondiendo a la demanda de los consumidores de alimentos sin aditivos químicos convencionales en la formulación y producción de estos (Aguilar-González & López-Malo, 2013; Ribes et al., 2017). Asimismo, la industria alimentaria busca técnicas que sean letales para los microorganismos patógenos causantes de

deterioro, pero que no tengan efectos adversos sobre el valor nutricional, las características organolépticas y la microbiota beneficiosa del producto (Ballester et al., 2022).

Una de las soluciones naturales más prometedoras es la biopreservación, la cual incluye el uso de microorganismos o sus metabolitos para prolongar la vida útil de los alimentos y/o aumentar la inocuidad de estos (Leyva Salas et al., 2017). La bioconservación por bacterias ácido lácticas (BAL) es actualmente la principal alternativa a los conservantes en alimentos y está ampliamente estudiada debido al papel y la larga historia de uso de BAL en alimentos fermentados, su capacidad para producir metabolitos antifúngicos, además del desarrollo de atributos organolépticos y la mejora de la salud dado a sus características probióticas (Ribes et al., 2017; Ben Said et al., 2019). Muchas de estas son reconocidas como seguras (GRAS) y Presunción Calificada de Seguridad (QPS) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) y la Unión Europea (UE), respectivamente y se utilizan cada vez más como cultivos bioprotectores en alimentos (Leyva Salas et al., 2017; Ben Said et al., 2019) .

El efecto protector de las BAL se debe a la producción de una gran variedad de moléculas que inhiben el crecimiento de hongos patógenos, donde se incluyen ácidos orgánicos, ciclopéptidos, reuterina, peróxido de hidrógeno y compuestos volátiles como diacetilo (Leyva Salas et al., 2017). Es por ello que han aumentado los estudios acerca de metabolitos secundarios producidos por BAL para su aplicación en la industria alimentaria, además, en la última década, el potencial bioprotector de las BAL ha estimulado esfuerzos considerables en la comunidad científica para identificar nuevas cepas con propiedades bioprotectoras a partir de diversas fuentes de alimentos, sobre todo cuando se trata de cepas que provienen de productos artesanales obtenidos por fermentación natural (Siedler et al., 2020). Por lo anterior, este estudio tuvo como objetivo determinar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes de BAL nativas de alimentos fermentados naturalmente, sobre 3 especies de hongos patógenos que se encuentran con frecuencia en alimentos, donde se incluyen *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general:

Determinar la capacidad antifúngica de los sobrenadantes de BAL nativas de alimentos fermentados naturalmente, sobre 3 especies de hongos patógenos que se encuentran con frecuencia en alimentos, donde se incluyen *Penicillium* sp., *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus*.

2.2. Objetivos específicos:

- i. Evaluar la actividad antifúngica de los sobrenadantes de BAL nativas de alimentos fermentados naturalmente, sobre 3 especies de hongos patógenos que contaminan frecuentemente alimentos
- ii. Caracterizar de manera preliminar los sobrenadantes obtenidos de cepas de BAL nativas de alimentos fermentados naturalmente.

3. Metodología

3.1. Microorganismos empleados

Se evaluaron 29 cepas de BAL, las cuales fueron proporcionadas por el grupo Biotransformación, obtenidas en el marco del proyecto “Alimentos vegetales con funcionalidad probiótica para poblaciones infantiles desnutridas PROIN-FANT”, en donde se muestrearon alimentos artesanales fermentados de diferentes regiones de Colombia, incluido masato de arroz, almidón de yuca agrio y champús. Las cepas de hongos: *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*, y *Aspergillus flavus*, fueron donadas por el grupo de investigación de Microbiología Ambiental, los cuales fueron aislados de matrices alimentarias. Ambos grupos de investigación pertenecen a la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia, Colombia.

3.2. Acondicionamiento de las cepas

Bacterias: La activación de las cepas de BAL se realizó a partir del banco de cepas que se tenían criopreservadas en caldo Man, Rogosa y Sharpe (MRS - Oxoid™, España) + glicerol (20%) a -80°C. Se descongeló cada cepa a temperatura ambiente, se tomaron 100 µL y se sembraron en 5 mL de caldo MRS, posteriormente se llevaron a incubación a 30 ± 2 °C en condiciones microaerófilas de 24 - 48 h. Transcurrido este tiempo, las cepas se sembraron por agotamiento en agar MRS y se incubaron en las condiciones anteriormente mencionadas durante 48 h. A partir de los cultivos obtenidos, se transfirieron de 2 a 3 colonias a 45 mL de caldo MRS y se incubaron

a 30 ± 2 °C en condiciones microaerofílicas. Después de un período de incubación de 48 horas, las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos, se filtraron a través de un filtro estéril de $0,22 \mu\text{m}$ y se refrigeraron a 4 ± 1 °C hasta su uso.

Hongos: Las tres cepas de hongos fueron cultivadas por punción en cajas de Petri con agar Extracto de Malta (MEA) preparado por componentes: 20 g Extracto de Malta (Oxoid™, España), 1 g Peptona (Oxoid™, España), 20 g Glucosa (Scharlau-Chemie, España) y 20 g Agar (Merck-Millipore, Alemania), según HiMedia Laboratorios (HiMedia Laboratoire, n.d.) y se dejaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por 5 días. Pasado este tiempo, se extrajeron las esporas adicionando sobre el cultivo aproximadamente 8 mL de una solución de Tween-80 al 0,05% (v/v), con un asa bacteriológica de aro estéril se realizó un raspado suave sobre la superficie del hongo por unos minutos, seguido de la recolección de la suspensión de esporas en un tubo falcón estéril. Posteriormente, se llevaron a cabo dos lavados con solución salina estéril al 0,85 % y de la última suspensión, se realizaron recuentos de esporas en cámara de Neubauer. Finalmente, se ajustó cada suspensión a una concentración de 10^4 esporas/mL utilizando solución salina al 0,85%.

3.3. Determinación de la actividad antifúngica de los sobrenadantes obtenidos de BAL

Para evaluar la actividad antifúngica de las BAL se tomó como referencia la metodología “mould agar spot assay” de Cabo, Braber y Koenraad (Cabo et al., 2002) y el método de “agar dilution”. El montaje del ensayo se realizó en microplacas de 24 pocillos con un volumen efectivo de 2 mL, donde se evaluaron diferentes concentraciones de los sobrenadantes de los cultivos de las BAL, donde a partir de un cribado preliminar se definieron las concentraciones a evaluar para cada hongo; para *Penicillium* sp. se ensayaron concentraciones que iban de 10 a 50 % (v/v), mientras que para las dos especies de *Aspergillus* de 40 a 70 % (v/v). Las diluciones inicialmente se prepararon para 1 mL de cultivo líquido y fueron ajustadas con 1 mL de MEA doblemente concentrado con el fin de que el medio resultante contara con los nutrientes requeridos para el crecimiento del hongo. Una vez solidificado el medio, se inoculó sobre el agar 10 μL de la suspensión de esporas (10^4 esporas/mL) y las placas se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) por una semana, con lecturas a los 3, 5 y 7 días. La actividad antifúngica se determinó de manera cualitativa a través del crecimiento del hongo sobre el agar expresado en Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se utilizó como control positivo de inhibición ácido láctico y acético en una concentración de 20%, como control positivo de crecimiento se reemplazó la solución del sobrenadante de BAL por agua destilada estéril. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

3.4. Caracterización preliminar de los sobrenadantes obtenidos de BAL

Los sobrenadantes de las cepas con mejor actividad antifúngica se caracterizaron; para ello se midió pH y acidez titulable expresada en porcentaje de ácido láctico (% p/v; ISO/TS 11869:2012) utilizando el titulador Orion Star T940 All-in-One de Thermo Scientific™, y se evaluó el contenido de ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico, fórmico, malónico y cítrico) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en el equipo Agilent 1100 VWD.

Se estudió la producción de ciertos metabolitos antifúngicos de las cepas de BAL por la reacción de los sobrenadantes con tres enzimas diferentes, dos proteolíticas (tripsina y pepsina) y una sacarolítica (α -amilasa) (Plockova et al., 2001), las cuales se prepararon en tampón buffer fosfato 1X ajustando al pH óptimo para cada una de las enzimas. Los sobrenadantes fueron neutralizados con NaOH al 5M (pH 6,5) y se realizaron ensayos de la siguiente manera: fracción A sobrenadante neutralizado, fracción B sobrenadante tratado con tripsina (1 mg/mL), fracción C sobrenadante tratado con α -amilasa (1 mg/mL) y fracción D sobrenadante ajustado a pH 4 con HCl (6M) y tratado con pepsina (1 mg/mL), posteriormente los tratamientos se incubaron a 37 ± 2 °C durante 2 horas y se ajustó el pH a 6,5 de la fracción D. Finalmente, la actividad antifúngica de los tratamientos se evaluó siguiendo la misma metodología utilizada para el sobrenadante inicial. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y expresados como \pm DS.

4. Resultados y discusión

En este estudio se evaluó la actividad antifúngica de sobrenadantes de BAL aisladas de alimentos fermentados artesanalmente, en donde se incluyeron 29 cepas pertenecientes a especies del género *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* y *Weissella*. Los resultados de la actividad antifúngica expresados como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en porcentaje del sobrenadante sobre los diferentes hongos evaluados, se presentan en la Tabla 1 [Tabla 1 cerca de aquí].

En la Tabla 1 se observa que 28 cepas de BAL presentaron inhibición sobre el crecimiento de al menos uno de los hongos, en las concentraciones de los sobrenadantes de BAL evaluadas entre 10 a 70%. Los sobrenadantes que demostraron mejores resultados de inhibición del crecimiento de los hongos fueron aquellos provenientes del género *Lactobacillus*, en donde se incluyen *Lactobacillus plantarum* YM345, *Lactobacillus plantarum* CY182, *Lactobacillus fermentum* YM468, *Lactobacillus buchneri* YD479 y *Lactobacillus paracasei* YM471, cuyo efecto se encontró entre 20 a 70% del sobrenadante. Se observó que *Penicillium* sp. presentó mayor sensibilidad a los metabolitos antifúngicos producidos por las BAL, debido a que aproximadamente el 93% de los sobrenadantes presentaron un efecto inhibitorio sobre su crecimiento, comparado con el 62% del efecto de los sobrenadantes sobre *A. flavus* y el 24% sobre *A. niger*.

El género *Lactobacillus* ha sido ampliamente estudiado debido a la producción de ácidos orgánicos (principalmente ácido láctico y acético), peróxido de hidrógeno, y otras sustancias, que muestran una fuerte actividad antifúngica, además este género de BAL produce bacteriocinas y péptidos similares a las bacteriocinas (El-Ssayad et al., 2022). La mayoría de las bacteriocinas producidas por especies de *Lactobacillus* son proteínas pequeñas y térmicamente estables, conocidas como bacteriocinas tipo II, las cuales pueden inducir la ruptura de la membrana celular

fúngica provocando la fuga del contenido celular, cambios en su permeabilidad a los cationes monovalentes pequeños y grandes macromoléculas como lo es el Adenosin Trifosfato (ATP) (Ribes et al., 2017; El-Ssayad et al., 2022).

Por otro lado, en la Tabla 1 es posible observar que solo el 44 % de los sobrenadantes mantuvieron una CMI constante en el tiempo, mientras que en el otro 56 % de la CMI aumentó al pasar de los días de lectura. Esto sugiere que los sobrenadantes de las cepas de BAL probadas tienen un efecto en su mayoría fungistático sobre la germinación de conidios (Laref et al., 2013).

Algunos ejemplos de los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antifúngica de los sobrenadantes de BAL, se muestran en la Figura 1 [Figura 1 cerca de aquí]. Los resultados permitieron observar que, a mayor concentración del sobrenadante de BAL, hubo un efecto retardante en el crecimiento de los hongos, que además presentaron cambios morfológicos asociados con la pigmentación del micelio, textura y superficie. Esto a su vez fue soportado en la visualización microscópica, donde solo se observaron estructuras de reproducción a bajas concentraciones, mientras que, al aumentar la concentración de sobrenadante de BAL, solo era posible observar extensiones de micelio (Figura 2) [Figura 2 cerca de aquí].

Lo anterior puede deberse a que los hongos, al encontrarse en una situación de estrés, usan diversos mecanismos para su supervivencia y crecimiento, lo cual le genera un costo energético exigente, dando como resultado reducciones drásticas en la glucólisis, la proliferación y la acumulación de biomasa (A. B. Snyder et al., 2019). Esto a su vez puede resultar en una reducción de la producción de micotoxinas, dado a que este proceso se inicia al final de la fase de crecimiento fúngico (Gomaa et al., 2018; Mínguez, 2020). Por otro lado, se han caracterizado enzimas producidas por BAL con la capacidad de degradar micotoxinas (Ben Taheur et al., 2019).

A partir de los resultados anteriores, se seleccionaron los sobrenadantes de BAL con mayor potencial antifúngico para caracterizarlos de manera química. En la Figura 3 [Figura 3 cerca de aquí] se presentan los resultados de la concentración de diferentes ácidos orgánicos presentes en los sobrenadantes obtenidos de BAL cuantificados mediante HPLC.

Estos resultados muestran que el ácido láctico se produce en mayor proporción encontrándose entre 11,44 y 32,36 g/L seguido del acético que se encontró entre 2,64 y 4,69 g/L y en menores concentraciones los ácidos propiónico, fórmico, cítrico y malónico. Las cepas que produjeron mayor concentración de ácido láctico fueron *L. plantarum* YM331, *L. plantarum* YM345 y *L. paracasei* YM471, mientras que *L. mesenteroides* CY196 y *Weissella cibaria* RY129 fueron las que produjeron una mayor concentración de ácido acético. Se evidenció la producción de ácido propiónico en el sobrenadante de la cepa *L. buchneri* YD479 y *L. lactis* RD91, así mismo para el fórmico incluyendo la cepa *L. paracasei* YM471 quien además fue la cepa con mayor concentración de ácido cítrico (1,92 g/L). Por su parte, la producción de ácido malónico se detectó en los sobrenadantes de *L. citreum* RD84, *L. plantarum* YM345, *L. plantarum* YM331 y

L. mesenteroides CY196. Es importante resaltar que la cepa *L. buchneri* YD479 presentó la mayor producción de ácidos con una concentración total de 45,17 g/L.

De las diversas moléculas resultantes del metabolismo de las BAL responsables de la actividad antifúngica, los ácidos orgánicos son de gran importancia para la inhibición del crecimiento de los hongos. La manera en la que estos ácidos orgánicos disminuyen el crecimiento fúngico se basa en su carácter débil, es decir, poseen un pKa más alto por lo que en su forma neutra o protonada del ácido (no disociada) se difunde pasivamente en el citoplasma a través de la membrana (Siedler et al., 2019; A. B. Snyder et al., 2019). Una vez dentro del citoplasma, el pH neutro hace que el ácido se disocie, lo que conduce a la acidificación del citosol y la acumulación de especies aniónicas (A. B. Snyder et al., 2019); en este sentido, la acumulación de iones tóxicos combinada con la ruptura de la membrana, la inhibición de reacciones metabólicas esenciales y/o estrés en la homeóstasis del pH intracelular puede conducir finalmente a la muerte celular (Leyva Salas et al., 2017).

La producción de estos ácidos conllevó a una disminución del pH del medio, lo cual también es un factor de gran importancia en la inhibición de los hongos, esto se debe a que la actividad antifúngica de los ácidos orgánicos depende del pH y especialmente se puede mantener una actividad de inhibición máxima a valores de pH bajos favoreciendo el estado no disociado de la molécula de ácido (Siedler et al., 2020). Teniendo en cuenta lo anterior, se realizaron mediciones de pH y acidez. Estos resultados se muestran en la Tabla 2 [Tabla 2 cerca de aquí].

En la Tabla 2, es posible observar que el pH de los sobrenadantes oscila entre 3,86 y 5,65 siendo el género *Lactobacillus* el que disminuyó en mayor proporción el pH del medio con un rango entre 3,86 y 4,05. Esto a su vez se vio reflejado en la acidez, encontrándose entre un rango de 0,17 y 0,19 % de ácido láctico (AL), resultados que son congruentes con las concentraciones de ácidos orgánicos producidas por este género y una mayor actividad antifúngica. Caso contrario a las cepas que redujeron en menor proporción el pH del medio, dado a que, a mayor pH la fracción no disociada de ácidos se reduce y, en consecuencia, su eficacia en el control de microorganismos también es menor (Moro et al., 2022).

Dado a que las BAL producen ácidos orgánicos, estos también podrían activar otros compuestos antifúngicos, tales como péptidos, al disminuir el pH (Laref et al., 2013). Para poder caracterizar estos y otros metabolitos antifúngicos aparte de los ácidos orgánicos, se estudió de manera indirecta la producción de otros compuestos que presuntamente disminuyen el crecimiento de los hongos mediante el tratamiento de los sobrenadantes con enzimas, por ejemplo, la producción de peróxido de hidrógeno (Fracción A), péptidos antimicrobianos (Fracción B y D) y exopolisacáridos (Fracción C). Estos resultados se muestran en la Tabla 3 [Tabla 3 cerca de aquí].

En este orden de ideas, las BAL producen una gran variedad de moléculas bioactivas en cantidades bajas y por debajo de su CMI individual (Leyva Salas et al., 2017), esto se puede

observar en la Tabla 3, donde las diferentes fracciones tratadas con enzimas disminuyeron su efecto antagónico sobre el hongo, lo que sugiere que la inhibición general se debe a la acción sinérgica o aditiva de estas moléculas bioactivas (Siedler et al., 2019). En este ensayo, solo fue posible observar una disminución en la actividad antifúngica para la fracción D, lo cual pudo estar asociado a los diferentes cambios de pH a los que se sometió.

Los resultados obtenidos en esta investigación en los que se tuvo un mayor efecto sobre el crecimiento de *Penicillium* sp. en comparación con las especies de *Aspergillus* coinciden con lo reportado por Andino y colaboradores, donde se evaluó la actividad antagónica de distintos aislados de BAL de alimentos fermentados frente a *Penicillium* sp. y *Aspergillus* sp., a través de las medidas del porcentaje de inhibición de su crecimiento encontrándose que fueron mayores para los aislados de *Penicillium* sp. con un valor de 22,5%, en comparación con *Aspergillus* sp., el cual fue inhibido medianamente por el 15% de los aislados de BAL (Andino Gualpa et al., 2021). Así mismo, se ha reportado una mayor capacidad para secretar ácidos orgánicos en *A. niger*, y por ende, una mayor adaptabilidad a ambientes ácidos (Li et al., 2016), característica importante para su supervivencia en condiciones de estrés generadas por la producción de ácidos orgánicos resultantes del metabolismo de BAL.

5. Conclusión

Los resultados obtenidos reflejan el potencial de las BAL, en especial del género *Lactobacillus*, y los medios fermentados por estas como conservantes de origen natural contra la pérdida de alimentos por contaminación fúngica, por lo que con base a la información presentada en este estudio se plantea la necesidad de generar nuevas estrategias basadas en el uso de los sobrenadantes de BAL como bioconservantes, de manera que aumenten la vida útil de los alimentos y reduzcan la presencia de micotoxinas.

6. Referencias Bibliográficas

- Aguilar-González, A., & López-Malo, A. (2013). Extractos y aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y su potencial aplicación como agentes antimicrobianos en alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 7(2), 35–41.
- Ahmad Azad, Z. R. A., Ahmad Fahim, M., & Ahmad Siddiqui, W. (2019). Food spoilage and food contamination. *Health and Safety Aspects of Food Processing Technologies*, 9–28. https://doi.org/10.1007/978-3-030-24903-8_2
- Andino Gualpa, L. V., Guasgua Mipaz, F. R., & Gallego Nuñez, J. M. (2021). *Evaluación in vitro de la actividad antagonista de las bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos fermentados sobre Penicillium sp y Aspergillus sp de granos de [Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]*. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/handle/123456789/15411>
- Ballester, E., Ribes, S., Barat, J. M., & Fuentes, A. (2022). Spoilage yeasts in fermented vegetables: conventional and novel control strategies. *European Food Research and Technology*, 248(2), 315–328. <https://doi.org/10.1007/S00217-021-03888-7/TABLES/3>
- Ben Said, L., Gaudreau, H., Dallaire, L., Tessier, M., & Fliss, I. (2019). Bioprotective Culture: A New Generation of Food Additives for the Preservation of Food Quality and Safety. *Industrial Biotechnology*, 15(3), 138–147. <https://doi.org/10.1089/IND.2019.29175.LBS>
- Ben Taheur, F., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Ben Salah-Abbès, J., & Chaieb, K. (2019). Review: Biotechnology of mycotoxins detoxification using microorganisms and enzymes. *Toxicon*, 160, 12–22. <https://doi.org/10.1016/J.TOXICON.2019.02.001>
- Cabo, M. L., Braber, A. F., & Koenraad, P. M. F. J. (2002). Apparent Antifungal Activity of Several Lactic Acid Bacteria against *Penicillium discolor* Is Due to Acetic Acid in the Medium. *Journal of Food Protection*, 65(8), 1309–1316. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-65.8.1309>
- El-Ssayad, M. F., Ibrahim, G. A., & Sharaf, O. M. (2022). Attempts to Improve Antimicrobial Efficiency by Mixed-Lactobacillus Extracts as Crude or Nano-formulated Against Pathogenic and Food Spoilage Bacteria, Molds and Yeasts. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 12(4), 5416–5430. <https://doi.org/10.33263/BRIAC124.54165430>
- Gomaa, E. Z., Abdelall, M. F., & El-Mahdy, O. M. (2018). Detoxification of Aflatoxin B1 by Antifungal Compounds from *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei*, Isolated from Dairy Products. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(2), 201–209. <https://doi.org/10.1007/S12602-017-9350-2/FIGURES/2>
- HiMedia Laboratorie. (n.d.). *Malt Extract Agar Base Composition** Intended Use: Type of*

specimen Specimen Collection and Handling. Retrieved May 2, 2022, from www.himedialabs.com

- Laref, N., Bettache, G., & Guessas, B. (2013). Antifungal activity of newly isolates of lactic acid bacteria Caractérisation of protease activity of Lactococcus species isolated from raw camel's milk View project antifungal lactic acid bacteria View project ANTIFUNGAL ACTIVITY OF NEWLY ISOLATES OF LACTIC ACID BACTERIA. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 13. <https://www.researchgate.net/publication/288664856>
- Leyva Salas, M., Mounier, J., Valence, F., Coton, M., Thierry, A., & Coton, E. (2017). Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. *Microorganisms* 2017, Vol. 5, Page 37, 5(3), 37. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS5030037>
- Li, Z., Bai, T., Dai, L., Wang, F., Tao, J., Meng, S., Hu, Y., Wang, S., & Hu, S. (2016). A study of organic acid production in contrasts between two phosphate solubilizing fungi: *Penicillium oxalicum* and *Aspergillus niger*. *Scientific Reports* 2016 6:1, 6(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep25313>
- Mínguez, C. L. (2020). *Actividad antifúngica y antitoxigénica in vitro y en alimentos de bacterias ácido lácticas* [Universidad de Valencia]. <https://roderic.uv.es/handle/10550/75462>
- Moro, C. B., Lemos, J. G., Gasperini, A. M., Stefanello, A., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2022). Efficacy of weak acid preservatives on spoilage fungi of bakery products. *International Journal of Food Microbiology*, 374, 109723. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2022.109723>
- Plockova, M., Stiles, J., Chumchalova, J., & Halfarova, R. (2001). Control of mould growth by *Lactobacillus rhamnosus* VT1 and *Lactobacillus reuteri* CCM 3625 on milk agar plates. *Czech Journal of Food Sciences*, 19(2), 46–50. <https://81.0.228.28/publicFiles/84632.pdf>
- Ribes, S., Fuentes, A., Talens, P., & Barat, J. M. (2017). Prevention of fungal spoilage in food products using natural compounds: A review. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1295017>, 58(12), 2002–2016. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1295017>
- Rico-Munoz, E., Samson, R. A., & Houbraken, J. (2019). Mould spoilage of foods and beverages: Using the right methodology. *Food Microbiology*, 81, 51–62. <https://doi.org/10.1016/J.FM.2018.03.016>
- Siedler, S., Balti, R., & Neves, A. R. (2019). Bioprotective mechanisms of lactic acid bacteria against fungal spoilage of food. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 138–146. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2018.11.015>

- Siedler, S., Rau, M. H., Bidstrup, S., Vento, J. M., Aunbjerg, S. D., Bosma, E. F., Mcnair, L. M., Beisel, C. L., & Neves, A. R. (2020). Competitive exclusion is a major bioprotective mechanism of lactobacilli against fungal spoilage in fermented milk products. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7). https://doi.org/10.1128/AEM.02312-19/SUPPL_FILE/AEM.02312-19-S0001.PDF
- Snyder, A. B., Biango-Daniels, M. N., Hodge, K. T., & Worobo, R. W. (2019). Nature Abhors a Vacuum: Highly Diverse Mechanisms Enable Spoilage Fungi to Disperse, Survive, and Propagate in Commercially Processed and Preserved Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18(1), 286–304. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12403>
- Snyder, A., & Worobo, R. (2018). Fungal spoilage in food processing. *Journal of Food Protection*, 81(6), 1035–1040. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-031>

7. Anexos

Tabla 1. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) expresada en porcentaje del sobrenadante de BAL (% v/v sobrenadante) para cada.

BAL evaluada		Hongo evaluado								
Código	Identificación	<i>Penicillium sp.</i>			<i>Aspergillus flavus</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
		Días de lectura								
		3	5	7	3	5	7	3	5	7
YM331	<i>Lactobacillus plantarum</i>									
YM345	<i>Lactobacillus plantarum</i>									
CY182	<i>Lactobacillus plantarum</i>									
YD479	<i>Lactobacillus buchneri</i>									
YD413	<i>Lactobacillus parabuchneri</i>									
CY201	<i>Lactobacillus paracasei</i>									
YD396	<i>Lactobacillus paracasei</i>									
YM471	<i>Lactobacillus paracasei</i>									
CY180	<i>Lactobacillus pentosus</i>									
Control	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>									
YM468	<i>Lactobacillus fermentum</i>									
RY125	<i>Lactococcus lactis</i>									
RD91	<i>Lactococcus lactis</i>									
RD84	<i>Leuconostoc citreum</i>									
RY130	<i>Leuconostoc citreum</i>									
RM102	<i>Leuconostoc lactis</i>									
CY209	<i>Leuconostoc lactis</i>									
CY157	<i>Leuconostoc lactis</i>									
RD94	<i>Leuconostoc lactis</i>									
RM101	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>									
CY196	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>									
RM121	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>									
CY191	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>									
RY141	<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>									
CD237	<i>Weissella cibaria</i>									
RY129	<i>Weissella cibaria</i>									
CY207	<i>Weissella cibaria</i>									
CM320	<i>Weissella cibaria</i>									
CD233	<i>Weissella cibaria</i>									

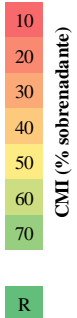


Tabla 2. pH y acidez expresada en porcentaje de ácido láctico (AL) de cada sobrenadante.

Código	Identificación	pH ± DS	Acidez (% v/v AL) ± DS
YD479	<i>Lactobacillus buchneri</i>	4,05 ± 0,21	0,11 ± 0,01
YM468	<i>Lactobacillus fermentum</i>	3,89 ± 0,01	0,18 ± 0,01
YM471	<i>Lactobacillus paracasei</i>	3,91 ± 0,01	0,19 ± 0,01
YM331	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,89 ± 0,14	0,17 ± 0,01
YM345	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,87 ± 0,01	0,19 ± 0,01
CY182	<i>Lactobacillus plantarum</i>	3,86 ± 0,01	0,19 ± 0,01
RD91	<i>Lactococcus lactis</i>	4,03 ± 0,73	0,09 ± 0,01
RD84	<i>Leuconostoc citreum</i>	4,18 ± 0,32	0,10 ± 0,01
CY196	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	5,65 ± 0,71	0,06 ± 0,01
RY129	<i>Weissella cibaria</i>	4,34 ± 0,05	0,15 ± 0,07

Tabla 3. Actividad antifúngica de fracciones obtenidas de los sobrenadantes de cultivo líquido de BAL tratadas con enzimas.

Código	Identificación	<i>Penicillium sp.</i>				<i>Aspergillus flavus</i>			
		Fracción							
		A	B	C	D	A	B	C	D
YD479	<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
YM331	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
YM345	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
YM471	<i>Lactobacillus paracasei</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
CY182	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	-	+	+	+	-
RY129	<i>Weissella cibaria</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
CY196	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
YM468	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
RD91	<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	+	-	+	+	+	+
RD84	<i>Leuconostoc citreum</i>	+	+	+	-	+	+	+	+

(+) Crecimiento (-) Antagonismo del hongo evaluado.

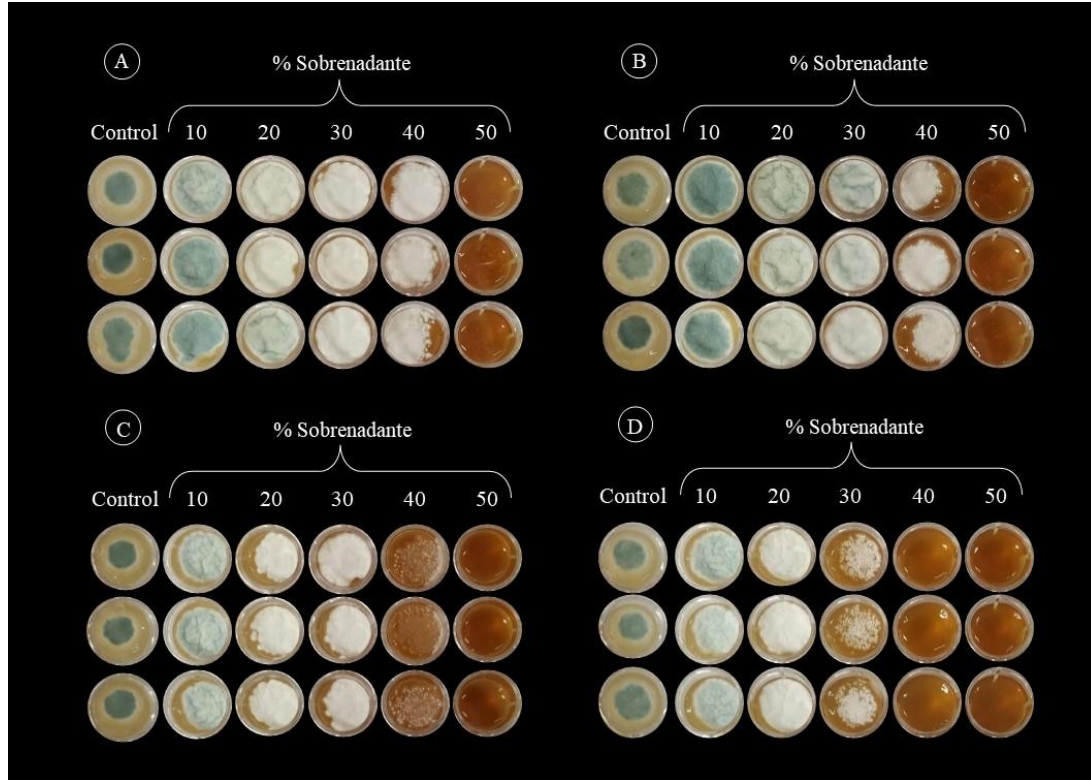


Figura 1. Resultados fotográficos de la actividad antifúngica sobre *Penicillium* sp. de los sobrenadantes de las cepas: **A.** *Leuconostoc lactis* (RD94), **B.** *Leuconostoc mesenteroides* (RM121), **C.** *Leuconostoc mesenteroides* (CY196), **D.** *Lactococcus lactis* (RD91). Lectura a los 3 días de incubación.

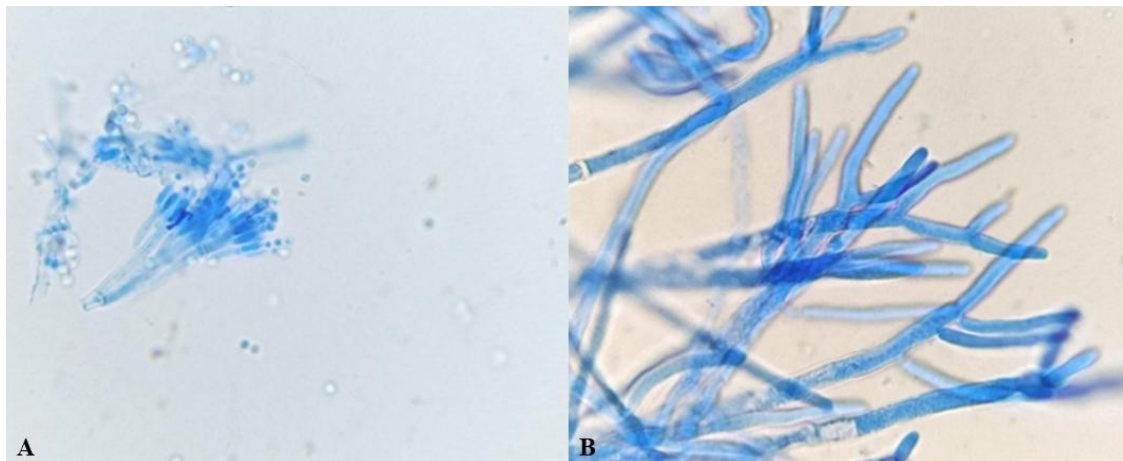


Figura 2. Microscopía de cultivos de *Penicillium* sp. después de exponerse al sobrenadante de la cepa *Leuconostoc lactis* (CY209). **A.** 10% sobrenadante (40X) **B.** 40% sobrenadante (100X). Lectura a los 7 días de incubación.

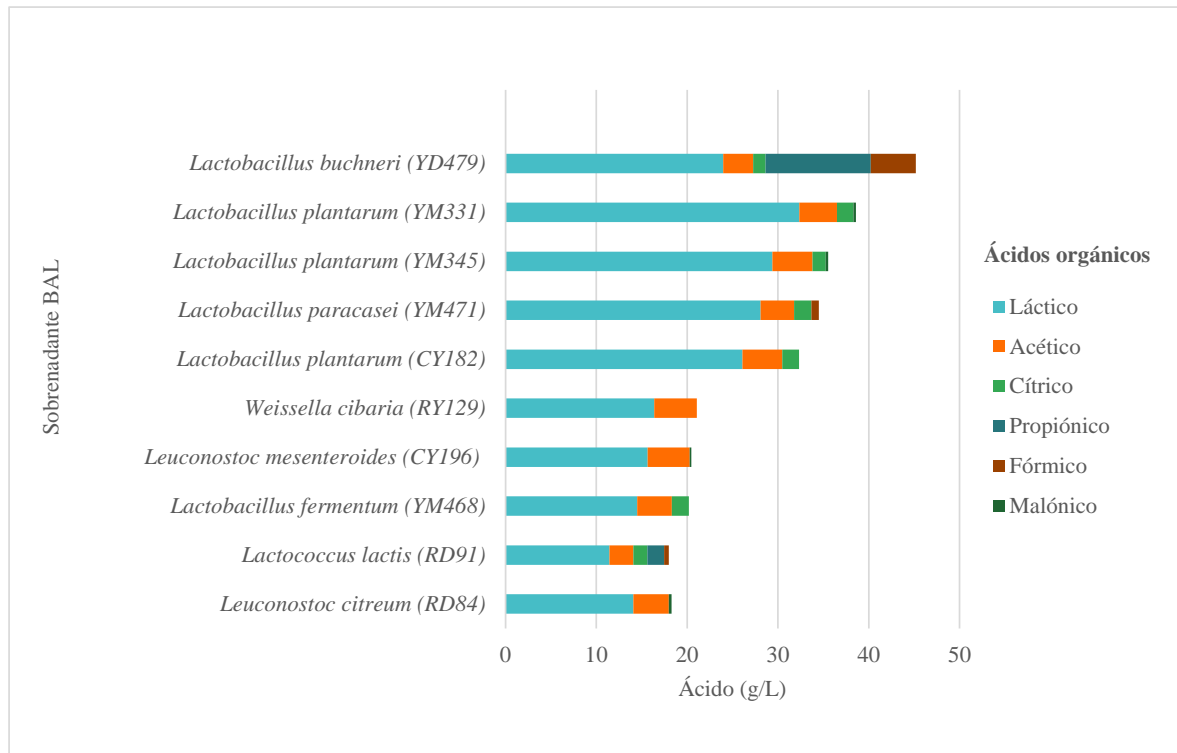


Figura 3. Concentración de diferentes ácidos orgánicos (g/L) producidos por las cepas de BAL.