

Producción y bioactividades de los exopolisacáridos de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG utilizando un diseño experimental Plackett-Burman

Production and bioactivities of the exopolysaccharides from *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG using a Plackett-Burman experimental design

Lucía María Cristina Ventura-Canseco^{1,*}, Rony Obed Suchiapa-Díaz¹, María Celina Luján-Hidalgo¹ y Miguel Abud-Archila¹

• Recibido: 29/09/2023
• Aceptado: 29/11/2023
• Publicado: 14/12/2023

Resumen

Los polisacáridos microbianos son biopolímeros biodegradables y biocompatibles producidos por bacterias, hongos y levaduras. La producción de exopolisacáridos (EPS) por bacterias ácido lácticas (BAL) ha ganado un interés especial durante la última década debido a las propiedades funcionales de estos biopolímeros. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de las condiciones de cultivo sobre la producción de EPS provenientes de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG, así como su actividad antibiopelícula y antioxidante. Los factores estudiados fueron las fuentes de carbono y nitrógeno, sus concentraciones, la temperatura y la velocidad de agitación. Utilizando un diseño experimental Plackett Burman con 12 tratamientos, se determinó que la fuente y concentración de nitrógeno tuvieron un impacto estadísticamente significativo en la producción de EPS, alcanzando su máximo (619.66 mg/L) en un medio con lactosa a 10 g/L y extracto de levadura a 15 g/L, incubado a 20 °C sin agitación. La actividad antioxidante varió entre 63.2% y 98.64%, mientras que la actividad antibiopelícula sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* fue influenciada significativamente por la fuente, concentración de nitrógeno y velocidad de agitación. Estas propiedades hacen que los EPS estudiados sean candidatos prometedores para aplicaciones en la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética.

Palabras clave

Actividad Antibiopelícula, Actividad Antioxidante, Bacterias Ácido Lácticas, Exopolisacáridos, *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG.

Abstract

Microbial polysaccharides are biodegradable and bio compatible biopolymers produced by bacteria, fungi, and yeasts. The production of exopolysaccharides (EPS) by lactic acid bacteria (LAB) has gained special interest over the last decade due to the functional properties of these biopolymers. The aim of this study was to evaluate the effect of cultivation conditions on the production of EPS from *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG, as well as its antibiofilm and antioxidant activity. The factors studied included carbon and nitrogen sources, their concentrations, temperature, and agitation speed. Using a Plackett Burman experimental design with 12 treatments, it was determined that the nitrogen source and concentration had a statistically significant impact on EPS production, reaching its maximum (619.66 mg/L) in a medium with 10 g/L lactose and 15 g/L yeast extract, incubated at 20 °C without agitation. Antioxidant activity ranged from 63.2% to 98.64%, while antibiofilm activity against *E. coli*, *S. aureus*, and *P. aeruginosa* was significantly influenced by the type of source (nitrogen or carbon), the concentration of nitrogen and the agitation speed. These properties make the studied EPS promising candidates for applications in the pharmaceutical, food, and cosmetic industries.

Keywords

Antibiofilm Activity, Antioxidant Activity, Exopolysaccharides, Lactic Acid Bacteria, *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG.

¹Tecnológico Nacional de México/Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez
Carretera Panamericana, km. 1080. C.P. 29050, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México
*Autora de correspondencia / Corresponding author: lucia.vc@tuxtla.tecnm.mx
 <https://orcid.org/0000-0003-3700-9749>

Introducción

Los polisacáridos son metabolitos sintetizados por un gran número de microorganismos, incluidos bacterias, hongos y levaduras (Moghannem *et al.*, 2018). Particularmente, algunas especies de bacterias ácido lácticas (BAL) pueden sintetizar y excretar polisacáridos extracelulares, llamados exopolisacáridos (EPS). Los EPS forman una capa que rodea a las células para protegerlas contra condiciones ambientales adversas como la deshidratación, temperatura extrema, estrés por acidez del medio, fagocitosis, macrófagos, antibióticos, entre otros. Los EPS producidos por BAL pueden ser capsulares (unidos a la célula) o pueden excretarse al medio de cultivo. En función de su composición química, los EPS se clasifican en homopolisacáridos (HoPS), constituidos por un solo tipo de monosacárido, y heteropolisacáridos (HePS) formados por dos o más tipos de monosacáridos (Jiang y Yang, 2018; Korcz y Varga, 2021). Uno de los hexopolisacáridos más utilizados a nivel comercial es la goma xantana, producida por *Xanthomonas campestris*, alcanzando niveles de entre 11 y 55 g/L, dependiendo de la cepa bacteriana empleada y las condiciones de su cultivo (Habibi y Khosravi-Darani, 2017). La producción de EPS por las BAL ha ganado especial interés debido a las propiedades funcionales de estos biopolímeros (Andrade *et al.*, 2019). Lo anterior debido a que las BAL son "generalmente reconocidas como seguras" (GRAS) y también son capaces de crear EPS con muchas estructuras diferentes sin ningún riesgo para la salud (Nguyen *et al.*, 2020). En especial, los EPS proporcionan algunas características reológicas importantes, como la textura y consistencia de ciertos alimentos, tales como quesos y yogurt (Andrade *et al.*, 2019). También, los EPS presentan actividad biológica variada, como actividad antitumoral, antioxidante, antibiopelícula, inmunomoduladora, prebiótica, entre otras. Por lo tanto, los EPS se consideran ingredientes valiosos en industrias de alimentos, farmacéutica y cosmética.

En cuanto a la actividad antibiopelícula, se ha descrito que algunas especies de *Lactobacillus* tienen actividad antimicrobiana contra varias bacterias formadoras de biopelículas. Wang *et al.* (2015) evaluaron los EPS producidos por *Lactobacillus plantarum* YW32 sobre la formación de biopelículas de cuatro patógenos: *Escherichia coli* O157, *Shigella flexneri* CMCC, *Staphylococcus aureus* AC1 y *Salmonella typhimurium* S50333. Estos autores reportaron un aumento en la inhibición de la biopelícula a medida que la concentración de EPS incrementó de 0.2 a 5.0 mg/mL. Así mismo, los EPS mostraron una mayor inhibición de la formación de biopelícula de *S. aureus* AC1 (45.13 %), *S. flexneri* CMCC (44.67 %) y *S. typhimurium* S50333 (44.04 %) en comparación con *E. coli* O157 (12.71 %).

Por otra parte, con respecto a la actividad antioxidante, Imran *et al.* (2016) utilizaron diferentes métodos para evaluar las actividades antioxidantes de EPS, incluida la actividad de eliminación de radicales libres del DPPH y el ensayo de potencial reductor. Los autores reportaron que la mayor actividad antioxidante se observó a una concentración de 500 µg/mL de EPS producidos por *Lpb. plantarum* NTMI05 y *Lpb. plantarum* NTMI20 con 96.62% y 91.86%, respectivamente. Elmansy *et al.* (2022) reportaron que a 5 mg/mL, los EPS de *Lpb. plantarum* RO30 mostraron una actividad de eliminación de radicales DPPH de 43.60%. Estos resultados indicaron que los EPS producidos por *Lpb. plantarum* tienen un amplio espectro de actividad antibiopelícula y antioxidante, que sería benéfico para su aplicación en la industria alimentaria. Sin embargo, las aplicaciones industriales son obstaculizadas por el bajo rendimiento en la producción de estos polisacáridos por las BAL, por lo que es importante investigar estrategias que permitan mejorar su producción.

En lo relacionado con la producción de EPS, según Lin *et al.* (2019), el uso de medios experimentales distintos al caldo MRS aumentó la concentración de EPS producidos por *Lactobacillus acidophilus*, pasando de 303 mg/L a 393.9 mg/L, lo que equivale a 1.3 veces la producción en un medio suplementado con lactosa. Por su parte, Moghannem *et al.* (2018) evaluaron la producción de exopolisacáridos por *Bacillus velezensis* KY471306 suplementado con diversas fuentes de nitrógeno (extracto de levadura, peptona, urea, (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl y KNO₃) y diversas fuentes de carbono (glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, almidón soluble, fructosa y melaza de caña de azúcar). Estos autores reportaron que la máxima producción de EPS (7780 ± 510 mg/L) se produjo utilizando extracto de levadura y melaza; así mismo, determinaron que dichos factores influyen en la composición de los EPS.

Lo anterior demuestra que la producción de EPS por BAL puede ser maximizada mediante cambios en los factores intrínsecos y extrínsecos durante su cultivo, sin embargo, muchos autores están buscando nuevas cepas productoras de EPS. En este contexto, Ramírez-Pérez *et al.* (2022) informaron que *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG produjo 478.0 ± 16.97 mg de EPS/L, mostrando así su potencial como una cepa candidata de interés industrial. Por todo lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar las condiciones de cultivo que afectan la producción, la actividad antibiopelícula y antioxidante de los exopolisacáridos de *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG mediante un diseño experimental Plackett-Burman.

Materiales y métodos

Lpb. plantarum BAL-29-ITTG fue proporcionada por la colección de cultivos del Laboratorio de Investigación del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. La cepa conservada en glicerol (30% v/v) a -18 °C se reactivó mediante dos transferencias sucesivas en caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharpe) empleando 10% (v/v) de inóculo. Los cultivos se incubaron durante 12 h a 37 °C con una agitación de 110 rpm en una agitadora LumistellMR modelo IRO 65 (Guanajuato, México).

Evaluación de las condiciones de cultivo

El efecto de las fuentes de carbono (lactosa y sacarosa) y su concentración (10 y 30 g/L), fuente de nitrógeno (extracto de levadura y sulfato de amonio) y su concentración (5 y 15 g/L), así como temperatura de incubación (20 °C y 40 °C) y agitación (0 y 150 rpm) sobre la producción de EPS de *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG, fue evaluado en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 90 mL de caldo. La composición del caldo base fue la del caldo MRS y se procedió a sustituir los componentes según el diseño experimental. Los matraces fueron inoculados al 10% (v/v) del inóculo e incubados durante 24 h. Al término de la fermentación, la producción de EPS de cada unidad experimental fue evaluada.

Cuantificación de exopolisacáridos

La cuantificación de EPS se realizó empleando el método reportado por Adesulu-Dahunsi *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Los cultivos se centrifugaron a 4500 rpm por 30 min a 4 °C, posteriormente, al caldo obtenido libre de células se le adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se agitó vigorosamente y se incubó a 4 °C durante 12 h. Los EPS precipitados fueron separados de la solución por centrifugación a 4500 rpm durante 30 min a 4 °C en una centrifuga marca HERMLE modelo Z326K (Wehingen, Alemania).

Los EPS precipitados se disolvieron en agua ultrapura y fueron sometidos a diálisis empleando membranas de 23 mm de ancho y 14.6 mm de diámetro (Spectra/Dialysis Membrane, MWCO 6-8 kD) durante 2 días (con cambio de agua cada 8 h). Los EPS purificados fueron liofilizados durante 48 h a 0.860 bar a -40°C en una liofilizadora marca LABCONCO modelo FreeZone4.5 (Kansas, EUA). Finalmente los EPS se pesaron para obtener la producción (mg/L).

Actividad antioxidante de los exopolisacáridos

La capacidad de captación de radicales DPPH de los EPS se determinó de acuerdo con la metodología empleada por Adesulu-Dahunsi *et al.* (2018), con algunas modificaciones. Un mL de la solución de DPPH (5×10^{-5} M) se adicionó a 2 mL de EPS (de 0.05 a 5 mg/mL) a pH 2, se agitó vigorosamente y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min en oscuridad. Posteriormente, se tomó lectura en el espectrofotómetro VELAB modelo VE-5600 UV (CdMx, Mexico) a 515 nm y se calculó la actividad antioxidante con la Ec. 1.

$$\text{Actividad antioxidante (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}} - \text{Abs}_{\text{blanco}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \quad (1)$$

Donde: $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ es 1 mL de DPPH + 2 mL de solución de EPS; $\text{Abs}_{\text{blanco}}$ es 2 mL de EPS (solución) + 2 mL de etanol y $\text{Abs}_{\text{control}}$ corresponde a 1 mL de DPPH + 2 mL de etanol.

Actividad antibiopelícula de los exopolisacáridos

La cuantificación de la actividad antibiopelícula de los EPS se realizó de acuerdo con la metodología empleada por Wang *et al.* (2015), con algunas modificaciones. Los respectivos cultivos de 24 h de *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* se diluyeron con caldo LB hasta una concentración final de 1.0×10^{-6} UFC/mL. De esas diluciones se agregaron 0.3 mL a tubos de ensayo que contenían 2.7 mL de caldo LB con 0.5 mL de alícuotas acuosas de EPS a diferentes concentraciones (0.2, 0.5, 1.0, 2.0 y 5.0 mg/mL) esterilizadas por filtración a través de un filtro de membrana de 0.45 μm (SIGMA-ALDRICH, EUA).

Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C con agitación a 130 rpm. Las biopelículas formadas por las cepas en ausencia de EPS se usaron como control. Al término de la incubación, los tubos se decantaron y secaron. Las células adheridas al tubo se tiñeron con 0.1 mL de cristal violeta al 2% (p/v). Posteriormente, el colorante que se unía a las células adheridas al tubo se solubilizó con 3 mL de ácido acético glacial al 33% (v/v). Se transfirieron alícuotas del colorante solubilizado de cada tubo (0.15 mL) a celdas de vidrio para espectrofotómetro y a cada celda se le agregaron 2.85 mL de ácido acético glacial al 33%. Finalmente, la absorbancia (Abs) a 590 nm se midió con un espectrofotómetro (VELAB modelo VE-5600 UV). La actividad antibiopelícula se calculó de acuerdo con la Ec. 2.

$$\text{Actividad antibiopelícula (\%)} = 100 * \left(1 - \frac{\text{Abs}_{\text{muestra}}}{\text{Abs}_{\text{control}}} \right) \quad (2)$$

Donde: $\text{Abs}_{\text{muestra}}$ es la formación de biopelículas con presencia de solución de EPS y $\text{Abs}_{\text{control}}$ es la formación de biopelícula sin solución de EPS.

Diseño experimental

El diseño experimental empleado fue un diseño de Plackett Burman con 12 tratamientos (**Tabla 1**), en donde los factores evaluados fueron las fuentes de carbono (lactosa y sacarosa), las fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y sulfato de amonio), concentración de fuentes de carbono (10 y 30 g/L), concentración de fuentes de nitrógeno (5 y 15 g/L), temperatura (20 y 40 °C) y agitación (0 y 150 rpm). Los resultados fueron analizados mediante un análisis de varianza ($p \leq 0.05$) empleando el software Statgraphics Centurion XVI.

Tabla 1. Tratamientos del diseño experimental de Plackett Burman para la producción de exopolisacáridos provenientes de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG

| Tratamiento | Fuente de | | Concentración de fuente (g/L) | | Temperatura (°C) | Agitación (rpm) |
|-------------|-----------|-----------|-------------------------------|-----------|------------------|-----------------|
| | Carbono | Nitrógeno | Carbono | Nitrógeno | | |
| T1 | S | E | 10 | 5 | 20 | 150 |
| T2 | S | N | 10 | 15 | 40 | 150 |
| T3 | S | E | 30 | 15 | 20 | 150 |
| T4 | S | N | 30 | 15 | 40 | 0 |
| T5 | L | N | 30 | 15 | 20 | 150 |
| T6 | L | E | 30 | 5 | 40 | 150 |
| T7 | L | N | 10 | 5 | 40 | 150 |
| T8 | L | N | 30 | 5 | 20 | 0 |
| T9 | L | E | 10 | 15 | 20 | 0 |
| T10 | L | E | 10 | 15 | 40 | 0 |
| T11 | S | N | 10 | 5 | 20 | 0 |
| T12 | S | E | 30 | 5 | 40 | 0 |

S=sacarosa L=lactosa E=extracto de levadura N=sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄)

Resultados y discusión

Producción de exopolisacáridos (EPS)

La producción de EPS evaluada con los diferentes tratamientos se presenta en la **Figura 1**. Se observa que la mayor producción de EPS se obtuvo en los tratamientos T3, T9 y T10 los cuales mostraron una producción de 801, 619 y 745 mg/L, respectivamente. Estos valores fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos en los otros tratamientos (T1, T2, T4, T5, T6, T7, T8, T11 y T12), que presentaron una producción de entre 380 y 510 mg/L.

El análisis de varianza mostró que la fuente de nitrógeno y su concentración tuvieron efecto estadístico significativo ($p < 0.05$) sobre la producción de EPS, como se presenta en la **Tabla 2**. Es importante mencionar que los tratamientos que presentaron la mayor producción de EPS compartían en común el extracto de levadura como fuente de nitrógeno y una concentración de 15 g/L. Las condiciones óptimas que corresponden a la máxima producción de EPS se muestran en la **Tabla 3**, las cuales corresponden al T9.

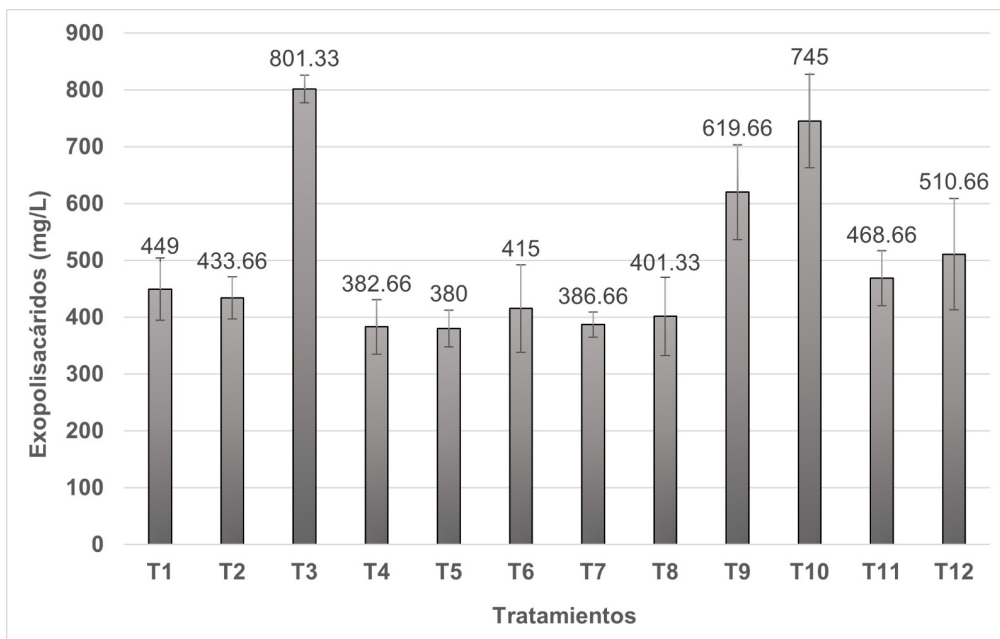


Figura 1. Producción de EPS por *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG en los tratamientos del diseño Plackett Burman

T1= sacarosa 10g/L, extracto de levadura 5g/L, 20°C, 150 rpm; T2= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, 150 rpm; T3= sacarosa 30g/L, extracto de levadura 15g/L, 20 °C, 150 rpm; T4= sacarosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, sin agitación; T5= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T6= lactosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T7= Lactosa 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T8= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 20 °C, sin agitación; T9=lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, sin agitación; T10= lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T11= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 5g/L, 20 °C, sin agitación; T12= sacarosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, sin agitación.

Tabla 2. Análisis de varianza para la producción de EPS de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG

| Fuente | Suma de cuadrados | GI | Cuadrado medio | Razón-F | Valor-P |
|--|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: Fuente de carbono | 2417.36 | 1 | 2417.36 | 0.23 | 0.6372 |
| B: Fuente de nitrógeno | 295755.0 | 1 | 295755.0 | 27.79 | 0.0000 |
| C: Concentración de fuente de carbono | 11200.7 | 1 | 11200.7 | 1.05 | 0.3134 |
| D: Concentración de fuente de nitrógeno | 133590.0 | 1 | 133590.0 | 12.55 | 0.0014 |
| E: Temperatura | 15170.0 | 1 | 15170.0 | 1.43 | 0.2422 |
| F: Agitación | 17204.7 | 1 | 17204.7 | 1.62 | 0.2136 |
| Error total | 308589.0 | 29 | 10641.0 | | |
| Total (corr.) | 783927.0 | 35 | | | |

Tabla 3. Factores óptimos para la producción de EPS de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG

| Factores | Nivel bajo | Nivel alto | Óptimo |
|--|-------------------|----------------------|----------------------|
| Fuente de carbono | Sacarosa | Lactosa | Lactosa |
| Fuente de nitrógeno | Sulfato de amonio | Extracto de levadura | Extracto de levadura |
| Concentración de fuente carbono (g/L) | 10.0 | 30.0 | 10.0 |
| Concentración fuente de nitrógeno (g/L) | 5.0 | 15.0 | 15.0 |
| Temperatura (°C) | 20.0 | 40.0 | 20.0 |
| Agitación (rpm) | 0.0 | 150.0 | 0.0 |

La producción de EPS empleando el tratamiento T9 resultó 29.63% mayor a la producción reportada por Ramírez-Pérez *et al.* (2022) quienes emplearon la misma cepa. La diferencia se debe a la concentración de extracto de levadura utilizada en este trabajo (15 g/L) en comparación con el caldo MRS (5 g/L) que utilizaron los autores mencionados. El efecto positivo del extracto de levadura a 15 g/L, en comparación con el sulfato de amonio sobre la producción de EPS en *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG posiblemente se debe a que el extracto de levadura contiene aminoácidos, vitaminas y minerales.

La preferencia por una fuente de nitrógeno orgánica puede indicar que el microorganismo requiera de algún aminoácido o vitamina (Clarke, 2013). Los aminoácidos, vitaminas y minerales presentes en el extracto de levadura (Moghannem *et al.*, 2018) favorecieron el crecimiento de *Lpb. plantarum* e indujeron probablemente la formación de nucleótidos, dando como resultado una sobreexpresión de los genes que codifican para la formación de enzimas que participan en la biosíntesis de EPS, provocando así el aumento de la producción según lo descrito por Xu *et al.* (2019).

Actividad antioxidante de los exopolisacáridos

La actividad antioxidante de los EPS se evaluó empleando diversas concentraciones (0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mg/mL). Las mayores actividades antioxidantes que presentaron los EPS se muestran en la **Figura 2** con valores que variaron entre 63 y 98%. Es importante señalar que todos los tratamientos mostraron una actividad antioxidante superior a la reportada por otros autores como Wang *et al.* (2015), Sasikumar *et al.* (2017) y Elmansy *et al.* (2022), quienes evidenciaron actividades antioxidantes de los EPS producidos por *Lpb. plantarum* YW32, BR2 y RO30, alcanzando 30, 29.80 y 43.60% respectivamente. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la concentración de EPS empleada por Wang *et al.* (2015) y Elmansy *et al.* (2022) fue de 5 mg/mL, una concentración superior a las empleadas en nuestros ensayos (0.5 a 2 mg/mL), que mostraron mayor actividad antioxidante.

La variación en la actividad antioxidante al cambiar la concentración de EPS sugiere que la composición de los EPS producidos por *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG contienen proporciones significativas de componentes antioxidantes. Estos actúan como donadores de electrones y reaccionan con el radical DPPH, reduciéndolo a su forma más estable. Sasikumar *et al.* (2017) evidenciaron que los EPS producidos por *L. plantarum* bajo condiciones adecuadas de medio, pueden tener propiedades hidrófilas y lipófilas de biosurfactantes. Las propiedades hidrolíticas y lipofílicas de los EPS pueden facilitar funciones como antioxidantes, interactuando con los radicales DPPH.

Por otra parte, el análisis de varianza mostró que no existió un efecto estadísticamente significativo ($p > 0.05$) con respecto a los factores evaluados sobre la actividad antioxidante (**Tabla 4**).

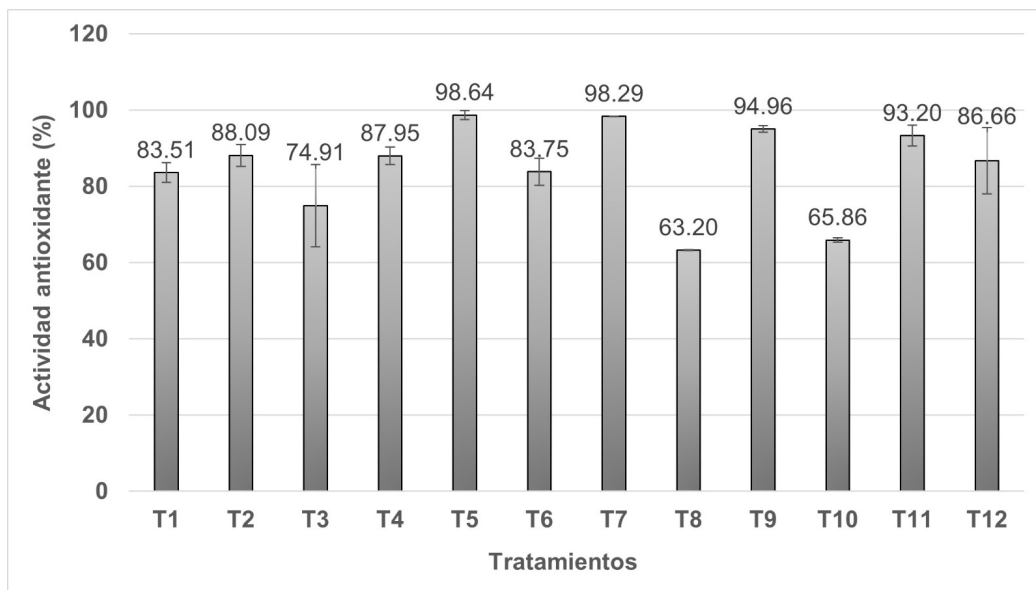


Figura 2. Actividad antioxidante de los exopolisacáridos producidos por *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG

T1= sacarosa 10g/L, extracto de levadura 5g/L, 20 °C, 150 rpm; T2= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, 150 rpm; T3= sacarosa 30g/L, extracto de levadura 15g/L, 20 °C, 150 rpm; T4= sacarosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, sin agitación; T5= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T6= lactosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T7= Lactosa 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T8= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 20 °C, sin agitación; T9=lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, sin agitación; T10= lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T11= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 5g/L, 20 °C, sin agitación; T12= sacarosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, sin agitación.

Tabla 4. Análisis de varianza de la actividad antioxidante de los EPS de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG

| Fuente | Suma de cuadrados | Gl | Cuadrado Medio | Razón-F | Valor-P |
|--|-------------------|----|----------------|---------|---------|
| A: Fuente de carbono | 23.1072 | 1 | 23.1072 | 0.15 | 0.7007 |
| B: Fuente de nitrógeno | 394.321 | 1 | 394.321 | 2.57 | 0.1196 |
| C: Concentración de fuente de carbono | 207.481 | 1 | 207.481 | 1.35 | 0.2542 |
| D: Concentración de fuente de nitrógeno | 0.79524 | 1 | 0.79524 | 0.01 | 0.9431 |
| E: Temperatura | 1.1786 | 1 | 1.1786 | 0.01 | 0.9307 |
| F: Agitación | 312.599 | 1 | 312.599 | 2.04 | 0.1640 |
| Error total | 4446.43 | 29 | 153.325 | | |
| Total (corr.) | 5385.91 | 35 | | | |

Actividad antibiopelícula de los exopolisacáridos

La actividad antibiopelícula de los EPS se evaluó en tres patógenos (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*), utilizando concentraciones de EPS 0.2, 0.5, 1, 2 y 5 mg/mL. Las concentraciones de EPS empleadas en este trabajo fueron las que presentaron mayor actividad antibiopelícula. Para *E. coli* (ver **Tabla 5**) la actividad antibiopelícula osciló entre 21 y 57%, excepto en el T11, que no mostró actividad. Estas actividades antibiopelícula fueron mayores a las reportadas por Wang *et al.* (2015) y Riaz-Rajoka *et al.* (2017) para EPS de *Lpb. plantarum* YW32 y *Lcb. rhamnosus* SHA117, respectivamente, quienes reportaron actividades antibiopelícula de 12.71 y 28.4% sobre *E. coli* a una concentración de EPS de 5 mg/mL.

En cuanto a las concentraciones de EPS utilizadas, estas fueron menores que las reportadas por los autores anteriormente mencionados, con excepción de los tratamientos T1 y T8, en los cuales se emplearon 5 mg/mL, similar a lo reportado por dichos autores. Sin embargo, la actividad antibiopelícula en estos dos tratamientos fue superior. La variación en la actividad antibiopelícula de los EPS producidos por *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG en comparación con los informes anteriores puede atribuirse a diferencias en las cepas y a las características estructurales únicas de los EPS, como la composición de monosacáridos, tipos de enlaces glucosídicos, contenido de proteína, peso molecular, grado de ramificación, entre otras (Guo *et al.*, 2017; Barbosa-Bomfim *et al.*, 2020), lo cual probablemente tiene efecto sobre sus actividades biológicas.

Los resultados de la actividad antibiopelícula de los EPS sobre *S. aureus* se presentan en la **Tabla 5**. La actividad varió entre 22 y 78%, excluyendo el tratamiento 11, que mostró una actividad casi nula. En general estas actividades antibiopelícula fueron mayores a las reportadas por Wang *et al.* (2015) quienes reportaron una actividad antibiopelícula de 45.13% sobre *S. aureus* con EPS de *L. plantarum* YW32 a una concentración de 5 mg/mL. Esta concentración fue superior a la utilizada en la mayoría de los ensayos a excepción de T3 y T12, donde se empleó la misma concentración y presentaron una actividad antibiopelícula similar sobre *S. aureus* en comparación con lo reportado por los autores anteriormente mencionados.

Los resultados de la actividad antibiopelícula de los EPS sobre *P. aeruginosa* se presentan en la **Tabla 5**. La actividad varió entre 30 y 77%, excluyendo el tratamiento 11, que no mostró actividad antibiopelícula. Liu *et al.* (2017) reportaron una actividad antibiopelícula de 47.02 ± 4.83 % a una concentración de 2 mg/mL sobre *P. aeruginosa* CMCC101014. Esta actividad fue similar a la obtenida con los EPS de los tratamientos T1, T2, T3, T6 y T7. Caso contrario, la actividad reportada por los autores anteriormente mencionados fue menor a la actividad obtenida con los EPS de los tratamientos T4, T8, T9, T10 y T12 cuya actividad osciló entre 65.12 y 76.58%.

Es importante destacar la escasez de reportes sobre la actividad antibiopelícula de los EPS producidos por *Lpb. plantarum* sobre *P. aeruginosa*. A pesar de que *P. aeruginosa* es ampliamente conocido como un patógeno oportunista en los humanos, en áreas de seguridad alimentaria es un microorganismo poco reconocido (Li *et al.*, 2023). Estos resultados sugieren que los EPS de *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG pueden ser una alternativa para mediar los diferentes procesos alimenticios en los cuales se ha reportado contaminación por *P. aeruginosa*. Por ejemplo, en la leche, donde los patógenos tienen la capacidad de producir biopelícula de manera facilitada, la cual se adhiere a la pared de los tanques de enfriamiento, latas y tuberías. Por otro lado, debido a las capacidades proteolíticas, lipolíticas y sacarolíticas de *P. aeruginosa* este puede estropear la carne (Meesilp y Mesil, 2019; Li *et al.*, 2023). También se ha aislado normalmente de verduras frescas y crudas, como pepinos, tomates, cebollas, zanahorias, lechugas, espinacas, apio y diferentes tipos de ensaladas (Xu *et al.*, 2019, p. 57; Li *et al.*, 2023). Debido a todo lo anterior y a nuestros resultados, los EPS de *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG podrían representar una alternativa para evitar la adhesión de *P. aeruginosa* a carnes y vegetales.

Tabla 5. Actividad antibiopelícula de los EPS de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*

| Tratamiento | Actividad antibiopelícula (%) | | | Concentración de EPS (mg/mL) empleada sobre | | |
|-------------|-------------------------------|------------------|----------------------|---|------------------|----------------------|
| | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>P. aeruginosa</i> |
| T1 | 46.43 ab | 61.87 ab | 42.34 b | 5.0 | 2.0 | 5.0 |
| T2 | 21.71 d | 22.64 de | 32.15 b | 0.5 | 2.0 | 5.0 |
| T3 | 25.20 cd | 41.05 bcd | 38.28 b | 1.0 | 5.0 | 5.0 |
| T4 | 42.60 ab | 35.78 cd | 71.33 a | 0.5 | 2.0 | 5.0 |
| T5 | 34.81 abcd | 62.02 ab | 33.60 b | 2.0 | 1.0 | 0.5 |
| T6 | 37.18 abc | 57.50 abc | 30.09 b | 5.0 | 2.0 | 5.0 |
| T7 | 32.24 bcd | 34.29 cd | 32.33 b | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| T8 | 48.82 a | 23.89 de | 69.83 a | 5.0 | 1.0 | 1.0 |
| T9 | 41.95 ab | 37.69 cd | 76.58 a | 0.2 | 1.0 | 2.0 |
| T10 | 34.22 bcd | 77.76 a | 71.33 a | 1.0 | 2.0 | 5.0 |
| T11 | 0.74 e | 1.25 e | 1.11 c | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| T12 | 36.27 abcd | 46.55 bcd | 65.12 a | 0.2 | 5.0 | 5.0 |
| Turkey 95% | 14.57 | 24.10 | 14.45 | | | |

Letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadística significativa ($p < 0.05$). T1= sacarosa 10g/L, extracto de levadura 5g/L, 20 °C, 150 rpm; T2= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, 150 rpm; T3= sacarosa 30g/L, extracto de levadura 15g/L, 20 °C, 150 rpm; T4= sacarosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15g/L, 40 °C, sin agitación; T5= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T6= lactosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T7= Lactosa 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 40 °C, 150 rpm; T8= Lactosa 30 g/L, (NH₄)₂SO₄ 5 g/L, 20 °C, sin agitación; T9=lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, sin agitación; T10= lactosa 10 g/L, extracto de levadura 15 g/L, 20 °C, 150 rpm; T11= sacarosa 10g/L, (NH₄)₂SO₄ 5g/L, 20 °C, sin agitación; T12= sacarosa 30 g/L, extracto de levadura 5 g/L, 40 °C, sin agitación.

Los resultados de la actividad antibiopelícula de los EPS sobre los tres patógenos fueron sometidos a análisis de varianza (**Tabla 6**). Los resultados indicaron un efecto estadísticamente significativo con respecto a los factores fuente de carbono para *E. coli*, fuente de carbono y nitrógeno para *S. aureus* y fuente de nitrógeno, concentración de fuente de nitrógeno y agitación para *P. aeruginosa*. El análisis estadístico indicó que el factor óptimo para *E. coli* es la lactosa, para *S. aureus* son la lactosa y el extracto de levadura y para *P. aeruginosa* son el extracto de levadura a una concentración de 15 g/L y el cultivo sin agitación. Al analizar los tratamientos proporcionados por el diseño, se encontró que los tratamientos que presentan estas condiciones son el tratamiento T9 y T10. Es importante mencionar que estos dos tratamientos presentaron la mejor producción de EPS, por lo que se sugiere el empleo de estas condiciones de cultivo para investigaciones futuras.

Tabla 6. Análisis de varianza de la actividad antibiopelícula de los EPS sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*

| Fuente | Valor-P <i>E. coli</i> | Valor-P <i>S. aureus</i> | Valor-P <i>P. aeruginosa</i> |
|--|---------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| A: Fuente de carbono | 0.0296 | 0.0111 | 0.0615 |
| B: Fuente de nitrógeno | 0.1120 | 0.0001 | 0.0160 |
| C: Concentración de fuente de carbono | 0.0628 | 0.3213 | 0.1188 |
| D: Concentración de fuente de nitrógeno | 0.9617 | 0.1066 | 0.0172 |
| E: Temperatura | 0.8010 | 0.1420 | 0.2230 |
| F: Agitación | 0.7771 | 0.0788 | 0.0001 |

La particular actividad antibiopelícula de los EPS sobre *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* se debe a la susceptibilidad de cada microorganismo, es decir, a la capacidad que posee cada patógeno para interactuar con los EPS. Autores como Wang *et al.* (2015) mencionaron que los EPS pueden mediar la actividad antibiopelícula de dos formas. Una es que los EPS tengan actividad antimicrobiana; sin embargo, en nuestro caso los EPS de *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG no presentaron actividad antimicrobiana sobre ninguna de las tres cepas evaluadas. La otra forma es modificando las superficies de las células bacterianas, inhibiendo la unión inicial de las células bacterianas a la superficie de adherencia o actuando como moléculas de señalización que regulan la expresión génica involucrada en la formación de biopelículas. Por lo tanto, es probable que los EPS producidos por *Lpb. plantarum* BAL-29-ITTG bloqueen los receptores o canales de la membrana bacteriana y modifiquen las superficies celulares bacterianas (Abdalla *et al.*, 2021), lo que se refleja como actividad antibiopelícula.

Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos bajo el diseño experimental de Plackett Burman para la producción de exopolisacáridos (EPS) provenientes de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG, las condiciones óptimas identificadas para maximizar la producción de EPS son la elección de lactosa como fuente de carbono y extracto de levadura como fuente de nitrógeno a concentraciones de 10 g/L y 15 g/L, respectivamente, a una temperatura de 20 °C y sin agitación.

Las condiciones anteriores, además de optimizar significativamente la producción de EPS, 29.63% mayor a la reportada empleando caldo MRS y la actividad antioxidante entre 63 y 98%, también confieren una alta actividad antibiopelícula, especialmente contra patógenos alimentarios como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* y *S. aureus*. La combinación de propiedades antioxidantes y actividad antibiopelícula de los EPS provenientes de *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG, producidos bajo las condiciones mencionadas, poseen un extraordinario potencial para diversas aplicaciones en los sectores industrial y comercial, incluyendo la industria farmacéutica, alimentaria y cosmética. Los resultados obtenidos permiten escalar a nivel bioreactor en futuras investigaciones donde se sugiere explorar aspectos como el pH, la agitación y la aireación con el fin de aprovechar al máximo el valor de los EPS producidos por *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG en diversas aplicaciones industriales.

Fuentes de financiamiento

Lucía Ma. Cristina Ventura Canseco recibió financiamiento del Tecnológico Nacional de México, con número de registro 16426.23-P, para desarrollar el proyecto "Estudio de exopolisacáridos producidos por *Lactiplantibacillus plantarum* BAL-29-ITTG" de lo que deriva este trabajo. Rony Obed Suchiapa Díaz, recibió financiamiento del CONAHCYT para realizar estudios de maestría, del cual deriva este trabajo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés que puedan influir en la objetividad, la integridad o la interpretación de los resultados presentados en este artículo.

Uso de inteligencia artificial

Durante la elaboración del presente trabajo los autores no utilizaron ninguna herramienta o servicio de IA.

Referencias

- Abdalla, A.K., Ayyash, M.M., Olaimat, A.N., Osaili, T.M., Al-Nabulsi, A.A., Shah, N.P. y Holley, R. 2021. Exopolysaccharides as antimicrobial agents: mechanism and spectrum of activity. *Frontiers in Microbiology*. 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.664395>
- Adesulu-Dahunsi, A. T., Sanni, A. I., Jeyaram, K., Ojediran, J. O., Ogunsakin, A.O., y Banwo, K. 2018. Extracellular polysaccharide from *Weissella confusa* OF126: Production, optimization, and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 111, 514-525. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.01.060>
- Andrade, L., Pereira, J. y Cardarelli, H. 2019. Exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*: technological properties, biological activity, and potential application in the food industry. *Annals of Microbiology*. 69, 321-328. doi: <https://doi.org/10.1007/s13213-019-01456-9>
- Barbosa-Bomfim, V., Pereira-Lopes Neto, J.H., Santos-Leiteb, K., De Andrade Vieira, E., Lacomini, M., Mellinger-Silva, C., Olbrich-Dos Santos, K.M. y Cardarelli, H.R. 2020. Partial characterization and antioxidant activity of exopolysaccharides produced by *Lactobacillus plantarum* CNPC003. *LWT - Food Science and Technology*. 127. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109349>
- Clarke K.G. 2013. *Bioprocess Engineering: An Introductory Engineering and Life Science Approach*. Woodhead Publishing; Cambridge, UK. *Microbiology*; pp. 7–24. doi: <https://doi.org/10.1533/9781782421689.7>
- Elmansy, E.A., Elkady, E.M., Asker, M.S., Abdou, A.M., Abdallah, N.A., y Amer, S.K. 2022. Exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* RO30 isolated from Romi cheese: characterization, antioxidant and burn healing activity. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 38(12): 245. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03439-6>
- Guo, M., Hu, X., Wang, C., Ai, L. 2017. Polysaccharides: structure and solubility. *Solubility of Polysaccharides*. 138. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71570>
- Imran, M., Reehana, N., Jayaraj, K.A., Ahamed, A., Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Alharbi, N.S. y Muralitharan, G. 2016. Statistical optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus plantarum* NTMI05 and NTMI20. *International Journal of Biological Macromolecules*. 93, 731-745. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.007>
- Jiang, Y. y Yang Z. 2018. A functional and genetic overview of exopolisaccharides produced by *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Food*. 47, 229-240. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.05.060>
- Korcz, E. y Varga, L. 2021. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Techno-functional application in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*. 110, 375-384. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.014>
- Li, X., Gu, N., Huang T.Y., Zhong, F. y Peng, G. 2023. *Pseudomonas aeruginosa*: A typical biofilm forming pathogen and an emerging but underestimated pathogen in food processing. *Frontiers in Microbiology*. 13, 1-8. doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1114199>
- Lin, T., Chen, C., Chen, B., Shaw, J. y Chen, Y. 2019. Optimal economic productivity of exopolysaccharides from lactic acid bacteria with production possibility curves. *Food Science and Nutrition*. 7(7), 2336-2344. doi: <https://doi.org/10.1002/fsn3.1079>
- Liu, Z., Zhang, Z., Liangqiu., Zhang, F., Peng Xu, X., Wei H. y Tao, X. 2017. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *Journal of Dairy Science*. 100, 6895-6905. doi: <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11944>
- Meesilp N. and Mesil N. 2019. Effect of microbial sanitizers for reducing biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* on stainless steel by cultivation with UHT milk. *Food Science Biotechnology*. 28, 289–296. doi: <https://doi.org/10.1007/s10068-018-0448-4>
- Moghannem, S., Farag, M., Shehab, A. y Azab, M. 2018. Exopolysaccharide production from *Bacillus velezensis* KY471306 using statistical experimental design. *Brazilian Journal of Microbiology*. 49(3), 452-462. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.05.012>
- Nguyen, P., Nguyen, T., Bui, D., Hong, P., Hoang, Q. y Nguyen, H. 2020. Exopolysaccharide production by lactic acid bacteria: the manipulation of environmental stresses for industrial applications. *AIMS Microbiology*. 6(4), 451-469. Doi: <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020027>
- Ramírez-Pérez, J.I., Álvarez-Gutiérrez, P.E., Luján-Hidalgo, M.C., Ovando-Chacon, S.L., Soria-Guerra, R.E., Ruiz-Cabrera, M.A., Grajales-Lugunes, A. y Abud-Archila, M. 2022. Effect of linear and branched fructans on growth and probiotic characteristics of seven *Lactobacillus* spp. isolated from an autochthonous beverage from Chiapas, Mexico, *Archives of Microbiology*. 7, 364. doi: <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02984-w>
- Riaz-Rajoka, M.S., Jin, M., Haobin, Z., Li, Q., Shao, D., Jiang, C., Huang, Q., Yang, H., Shi, J. y Hussain, N. 2017. Functional characterization and biotechnological potential of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk, *LWT - Food Science and Technology*. 89, 638-647. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.034>

- Sasikumar, K., Vaikkath, D.K., Devendra, L. Nampoothiri, y K.Madhavan. 2017. An exopolysaccharide (EPS) from a *Lactobacillus plantarum* BR2 with potential benefits for making functional foods, *Bioresource Technology*. 241, 1152-1156 doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.075>
- Wang, J., Zhao, X., Yang, Y., Zhao, A. y Yang, Z. 2015. Characterization and bioactivities of an exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* YW32. *International Journal of Biological Macromolecules*. 74, 119–126. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.12.006>
- Xu, Y., Cui, Y., Yue, F., Liu, L., Shan, Y., Liu, B., Zhou, Y. y Lü, X. 2019. Exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria and Bifidobacteria: Structures, physiochemical functions and applications in the food industry. *Food Hydrocolloids*. 94, 475-499. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.03.032>
- Xu Z., Xie J., Soteyome T., Peters B. M., Shirliff M. E., Liu J., et al. 2019. Polymicrobial interaction and biofilms between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: an underestimated concern in food safety. *Current Opinion In Food Science*. 26, 57–64. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.03.006>