

Actividad antimicrobiana del 3-hidroxi propionaldehído producido por *Limosilactobacillus reuteri* cultivada en caldo MRS sustituyendo la fuente de carbono

Antimicrobial activity of 3-hydroxypropionaldehyde produced by *Limosilactobacillus reuteri* cultivated in MRS broth replacing the carbon source

Menéndez García O. F.¹, García Zamarrón D. A.¹, Hernández Barrientos R.¹, Báez González J. G.², Morales-Landa J. L.³, Luiz Santos N.³, Escamilla García E.^{1*}.

¹ Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de Biotecnología. Av. Manuel Barragán, Ciudad Universitaria, 66455 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. oscar.menindezg@uanl.edu.mx; diego.garciaz@uanl.edu.mx; rodrigo.hernandezbr@uanl.edu.mx

*Correspondencia: erandi.escamillagrc@uanl.edu.mx

² Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Alimentos. Pedro de Alba SN, Niños Héroes, Ciudad Universitaria, 66450 San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México. juan.baezgn@uanl.edu.mx

³ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ), Subsede Noreste. Autopista Mty-Aeropuerto, Vía de la Innovación 404, Parque PIIT, 66628 Ciudad Apodaca, Nuevo León, México. jmorales@ciatej.mx; nsantos@ciatej.mx

Resumen:

El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de la celobiosa al 1% como fuente principal de carbono en un cultivo MRS de *Limosilactobacillus reuteri*, formulado para la biotransformación de glicerol a 3-hidroxi propionaldehído, un agente antimicrobiano de amplio espectro. Se utilizó *Escherichia coli* O157:H7 como organismo modelo para evaluar el efecto de la inhibición bacteriana. Un segundo caldo MRS formulado con 1% de glucosa y un caldo MRS comercial estándar fueron utilizados como comparativos. El 3-HPA utilizado fue producido durante la fase exponencial de crecimiento (2 a 12 horas) de cada cultivo MRS. El 3-HPA producido en los medios con celobiosa y MRS comercial inhibió $45.01 \pm 18.51\%$ y un $35.94 \pm 7.76\%$ ($p > 0.05$) respectivamente el crecimiento de *E. coli*, mientras que un $8.50 \pm 0.37\%$ de inhibición con el 3-HPA producido en cultivo MRS con glucosa. Como agente antiséptico de control, se utilizó la clorhexidina al 0.12%, arrojando un $97.61 \pm 0.05\%$ de inhibición. Se concluye que la fuente de carbono inicial modifica el potencial antimicrobiano del 3-HPA, siendo la celobiosa un sustrato candidato para continuar su estudio en la optimización de la secreción de metabolitos activos, lo que resalta su importancia en el desarrollo de alternativas para el control microbiano y la economía circular.

Palabras clave: *Limosilactobacillus reuteri*, 3-hidroxi propionaldehído, actividad antimicrobiana, caldo MRS-Celobiosa, caldo MRS-Glucosa.

ABSTRACT:

The aim of this study was to determine the effect of 1% cellobiose as the main carbon source in an MRS culture of *Limosilactobacillus reuteri*, formulated for the biotransformation of glycerol to 3-hydroxypropanal, a broad-spectrum antimicrobial agent. *Escherichia coli* O157:H7 was used as a model organism to evaluate the effect of bacterial inhibition. A second MRS broth formulated with 1% glucose and a standard commercial MRS broth were used as comparatives. The 3-HPA used was produced during the exponential growth phase (2 to 12 hours) of each MRS culture. The 3-HPA produced in the media with cellobiose, and the commercial MRS broth inhibited $45.01 \pm 18.51\%$ and $35.94 \pm 7.76\%$ ($p > 0.05$) respectively of *E. coli* growth, while $8.50 \pm 0.37\%$ inhibition occurred with the 3-HPA produced in MRS culture with glucose. As a control antiseptic agent, 0.12% chlorhexidine was used, showing $97.61 \pm 0.05\%$ inhibition. It is concluded that the initial carbon source modulates the antimicrobial potential of 3-HPA, with cellobiose as a candidate substrate for further study to optimise active metabolite secretion, highlighting its importance in the development of alternatives for microbial control and the circular economy.

Keywords: *Limosilactobacillus reuteri*, 3-Hydroxypropionaldehyde, Antimicrobial activity, MRS broth-Cellobiose, MRS broth-Glucose.

INTRODUCCIÓN

Limosilactobacillus reuteri (antes denominada *Lactobacillus reuteri*) es una bacteria ácido-láctica heterofermentativa grampositiva que coloniza de forma natural el tracto gastrointestinal de humanos y animales. Como resultado de la revisión taxonómica del género *Lactobacillus*, basada en análisis filogenómicos, genómicos, fisiológicos y ecológicos, la especie fue reclasificada como *Limosilactobacillus reuteri* (Zheng et al., 2020). Esta bacteria presenta morfología bacilar y crecimiento en condiciones microaerofílicas, características asociadas con su adaptación y persistencia en ambientes gastrointestinales y con su potencial de aplicación en la industria alimentaria (Ali et al., 2023; Mu et al., 2018). *L. reuteri* posee la capacidad para utilizar diferentes carbohidratos, cuya disponibilidad y naturaleza pueden modificar su crecimiento y metabolismo. Estudios recientes han evidenciado la capacidad metabólica de *L. reuteri* para asimilar y degradar una gran variedad de carbohidratos, incluidos monosacáridos como la glucosa, y disacáridos como la celobiosa, con diferencias en la estimulación del crecimiento, y también en la producción de metabolitos según el sustrato empleado (Morales-Landa et al., 2025; Napoleon, 2019). Como bacteria heterofermentativa, *L. reuteri* metaboliza los carbohidratos principalmente mediante la vía de la fosfocetolasa, generando lactato, acetato, etanol y CO₂, entre otros productos de fermentación. Entre los metabolitos de interés producidos por *L. reuteri* destaca el 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) comúnmente conocido como reuterina. Este compuesto se genera a partir del glicerol mediante la acción de la glicerol deshidratasa (GDHt) a 3-HPA, una enzima dependiente de coenzima B₁₂. La conversión de glicerol a 3-HPA constituye una ruta metabólica relevante en *L. reuteri* y se asocia con el sistema de utilización de glicerol codificado por el agrupamiento de genes *pdu* (Talarico et al., 1988; Schaefer et al., 2010). Al ser excretada de la célula, el 3-HPA se encuentra en solución acuosa formando un sistema dinámico constituido principalmente por su forma libre, su forma hidratada y su dímero, y puede experimentar deshidratación espontánea para generar acroleína (Sun et al., 2022). Esta característica debe considerarse al estudiar la actividad biológica atribuida al denominado sistema reuterina.

La reuterina presenta actividad antimicrobiana de amplio espectro frente a diversos microorganismos, su acción se ha relacionado con la elevada reactividad del grupo aldehído del 3-HPA hacia grupos tiol presentes en glutatión, proteínas y otras moléculas celulares, lo que altera el equilibrio redox y genera estrés oxidativo en las células susceptibles (Schaefer et al., 2010; Sun et al., 2022). En este sentido, *L. reuteri* ha demostrado capacidad para inhibir diversos patógenos entéricos incluyendo *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* y otros microorganismos de importancia para la inocuidad alimentaria y la salud pública (Spinler et al., 2008; Urrutia-Baca et al., 2016; Ali et al., 2023). Sin embargo, la actividad antimicrobiana de los cultivos de *L. reuteri* no es dependiente de la concentración de reuterina. Se ha observado que la cantidad de reuterina producida por diferentes cepas, no siempre se correlaciona con la capacidad inhibitoria, lo que sugiere la posible participación de otros metabolitos antimicrobianos y efectos sinérgicos (Spinler et al., 2008).

En este contexto, la fuente de carbono disponible durante el crecimiento constituye un factor relevante para modular el metabolismo de *L. reuteri* y, potencialmente, el perfil de metabolitos antimicrobianos producido. La glucosa y celobiosa presentan diferencias estructurales (**Fig. 1**) y fisicoquímicas que pueden influir en su disponibilidad, transporte y utilización metabólica en los microorganismos (**Tabla I**). Mientras que la glucosa es un monosacárido (**Fig. 1A**) que puede incorporarse directamente al metabolismo central, la celobiosa es un disacárido constituido por dos unidades de glucosa unidas mediante un enlace β -(1 $\rightarrow$ 4), (**Fig. 1B**), por lo que su aprovechamiento requiere de etapas adicionales de transporte y/o hidrólisis (Nishimura et al., 2014).

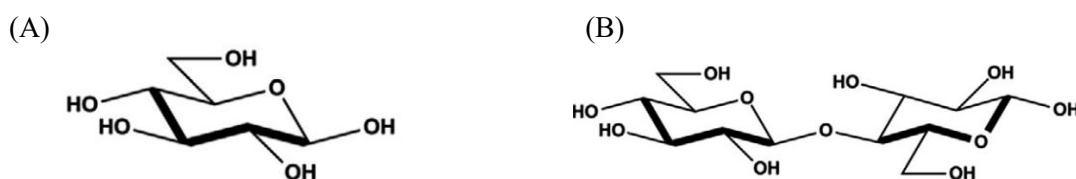


Figura 1. Estructura química de la glucosa-monosacárido (A) y de la celobiosa-disacárido (B). Fuente elaboración propia a partir de Ries et al., (2014) y National Center for Biotechnology Information (NCBI 2026a; NCBI 2026b). PubChem Compound.

Además de su interés como fuente de carbono, la celobiosa puede obtenerse mediante la hidrólisis enzimática o química de materiales lignocelulósicos, en los que la celulosa constituye uno de los principales componentes estructurales. De ahí que su utilización en procesos fermentativos represente una alternativa potencial para valorizar recursos renovables y subproductos agroindustriales, particularmente cuando estos materiales se integran en esquemas de fraccionamiento y aprovechamiento de biomasa.

Tabla I. Propiedades fisicoquímicas generales de la glucosa y de la celobiosa.

PROPIEDAD FISICOQUÍMICA	GLUCOSA	CELOBIOSA
Peso Molecular	180.16 g/mol ^d	342.30 g/mol ^e
Carga	Neutra ^d	Neutra ^e
ΔG (kcal/mol)	-686 ^b	5.276 ^e
T (°C)	150 ^a	236.85 ^a
Tipo de enlace glicosídico	-	β -(1→4)

^aHeng et al. (2021); ^bCooper (2000); ^cZhang et al. (2014); ^{d,e}National Center for Biotechnology Information (2026).

Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de la sustitución de glucosa por celobiosa como fuente de carbono sobre la producción de 3-HPA y la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos durante el crecimiento de *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 55730, utilizando *Escherichia coli* O157:H7 como microorganismo indicador. Asimismo, se comparó el comportamiento de la cepa cultivada en un medio formulado con 1% de celobiosa con un medio formulado con 1% de glucosa y con medio MRS comercial, con el propósito de determinar si la fuente de carbono empleada durante el cultivo modifica el potencial antimicrobiano de los metabolitos producidos por la bacteria.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio presentado fue experimental, con ensayos *in vitro*, y comprendió tres cultivos de *L. reuteri* ATCC 55730TM en caldo comercial Man Rogosa and Sharpe (MRS, BD-Difco, Becton Dickinson & Co, Francia), con cuatro réplicas por cultivo. A partir de caldo MRS sin dextrosa (Condalab® 1225, Madrid-España, cumple con normas ISO 9001:2015 e ISO 13485:2016 relativas a la gestión de calidad y a dispositivos médicos), se formuló un caldo de cultivo reemplazando el 2% de glucosa del medio comercial por 1% de D-(+)-celobiosa (22150, Millipore Merk, Sigma Aldrich, Missouri-EUA) como principal fuente de carbono y medio de interés en este estudio. El segundo medio se formuló con 1% de glucosa (glucosa anhidra USP, CTR Scientific 132171, México), como medio comparativo y, para el tercer medio de cultivo, se utilizó el medio comercial como referencia.

Conservación y Activación de *Limosilactobacillus reuteri*

Los procedimientos experimentales comprendieron la activación de *L. reuteri* y el precultivo, realizados de acuerdo con las recomendaciones de la ficha técnica de la American Type Culture Collection (ATCC®) y considerando un estudio realizado con anterioridad (Baca-Castañón et al., 2015). A partir de un vial con *L. reuteri* preservado en una solución criogénica salina con glicerol al 30% (Glicerina RA CTR Scientific 02856, México), se tomó una muestra de 100 μ L para activarla en 30 mL de caldo MRS contenido en un tubo de centrifugación cónico estéril de 50 mL (Corning® Science Mexico S.A de C.V., 430828, Tamaulipas-México), para incubarse por 24 h a 37 °C (VWR Model 2300 / Shel Lab Sheldon 9150931 CO₂, EUA). Transcurrido este tiempo, se recuperó el paquete celular o pellet por centrifugación a 4000 x g, por 5 min a 20 °C, considerando dos lavados con solución estéril de buffer salino de fosfatos PBS-1X (Mediatech, Inc, Virginia-EUA). El paquete celular resultante, fue utilizado para sembrar cajas Petri con agar MRS para subsecuentes activaciones en los ensayos del estudio. Por otra parte, los ensayos para el establecimiento de la cinética de crecimiento se

consideraron con base en el trabajo previo de Baca-Castañón et al. (2015). Matraces Erlenmeyer de 500 mL (Pyrex®, Alemania) fueron utilizados con un volumen de trabajo (caldos MRS) de 210 mL, previamente esterilizados 15 min a 121 °C (Autoclave AllAmerican No 50X, Wisconsin-EUA), para su inoculación a una Densidad Óptica_{600nm}=0.2 en la escala de McFarland ajustada con un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific Evolution, One Plus 840-341500, China), equivalente a 2.05×10^8 células/mL e incubados para su crecimiento a 37 °C en atmósfera anaerobia (System GasPak® BD Dickinson, Francia) durante 24 h.

Obtención de muestras de 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA)

Entre tanto (durante 24 h), cada 2 h se tomó una muestra de los cultivos de cada matraz para realizar el procedimiento de aislamiento y cuantificación de 3-HPA (Urrutia-Baca et al., 2018). Las células de *L. reuteri* fueron separadas del sobrenadante (el cual se reservó) por centrifugación (Centrífuga I, PRO-RESEARCH.K1241R CENTURION SCIENTIFIC, Reino Unido) a 4000 x g, por 5 min a 20 °C. El sedimento bacteriano fue lavado dos veces (2X) con solución PBS-1X, resuspendido en glicerol 250 mM e incubado durante 2 a 4 h en las mismas condiciones de cultivo, para estimular la bioconversión a 3-HPA descrita por Urrutia-Baca et al. (2018).

Por centrifugación se recuperaron los sobrenadantes a $8000 \times g$, 10 min a 20 °C, mismos que fueron acondicionados junto con el sobrenadante antes reservado, para evaluar la presencia de 3-HPA contenido en ambas muestras, se utilizó acroleína (Sigma-Aldrich, New Jersey-EUA) como estándar de calibración, mediante un método colorimétrico (Circle et al., 1945), a una longitud de onda de 560 nm por espectrofotometría (Urrutia-Baca et al., 2018). Se utilizaron celdas desechables de 1.5 mL (semi-micro PMMA 759085D, Brand, ISO 9001-14001, Alemania). Las curvas de crecimiento y la evaluación de parámetros cinéticos corresponden a otro estudio en curso. Todas las muestras de 3-HPA se conservaron al abrigo de la luz y en refrigeración a 4 °C hasta su uso.

Activación y curva de crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7

Para los ensayos de actividad antimicrobiana, *Escherichia coli* O157:H7 ATCC BAA-1883™ fue activada de acuerdo con la ficha técnica de la ATCC® en caldo Trypticaseína de Soya (TS, MCD LAB, Oaxaca-México), a 37 °C por 24 h, a partir de un cultivo en agar TS en caja de Petri. Los medios de cultivo siguen la norma NOM-241-SSA1-2025 y cuentan con certificación ISO 9001:2015. Para conocer el punto logarítmico de crecimiento de *E. coli* (punto de mayor patogenicidad) se realizó una curva de crecimiento con un inóculo de inicio de $DO_{600nm} = 0.1$ en la escala de McFarland en un matraz de 125 mL y un volumen de trabajo de 50 mL de caldo TS. Transcurrido el tiempo, el sedimento o paquete bacteriano fue recuperado por centrifugación a 4000 rpm durante 5 min a 20-25 °C, para posteriormente lavarse (2X) con PBS-1X y ser resuspendido para ajustar la densidad celular a 0.1 en la escala de McFarland mediante la fórmula de concentraciones y diluciones $C_1V_1 = C_2V_2$, como preámbulo al procedimiento de los ensayos de actividad antimicrobiana. La cinética de crecimiento se realizó por triplicado, se tomaron 3 mL de muestra cada 20 min desde el momento de la inoculación (tiempo 0 h). Las muestras fueron utilizadas para medir el pH (Denver Instruments, UltraBasic Benchtop Meter UB-10, Arvada/CO-EUA) y la Densidad Óptica a una longitud de onda de 600 nm.

Determinación de la actividad antimicrobiana del 3-HPA

El ensayo de microdilución en placa es un método cuantitativo que permite determinar la cantidad necesaria de una sustancia o molécula para inhibir el crecimiento de un microorganismo (Andrews, 2001), este ensayo se realizó tomando como base el estudio realizado por Escamilla-García et al. (2017). Se requirió de placas estériles de 96 pozos de fondo plano y claro (Poliestireno, Corning® Incorporated Costar 3599, Maine-EUA) considerando un volumen final de trabajo de 200 µL. El volumen compuesto por 20 µL del 3-HPA producido en los tiempos de la fase exponencial de crecimiento de *L. reuteri* (2, 4, 6, 8, 10, 12 h) de cada medio de cultivo MRS (1.4-1.5 mg/mL en el medio formulado con 1% de celobiosa; 1.5-1.75 mg/mL en el medio formulado con 1% de glucosa y de 1.3-2.0 mg/mL en el medio de referencia), caldo TS estéril y 1% de *E. coli* en el punto máximo logarítmico de crecimiento. El 3-HPA como referencia, la lectura a 600 nm en el espectrofotómetro. Los ensayos se realizaron en placas independientes, por duplicado, identificadas por el medio de cultivo MRS de procedencia. En todas las placas se consideraron controles de crecimiento de *E. coli* y de reacción con el

medio de cultivo, así como un control positivo de clorhexidina al 0.12% (Perioxidin® Lacer S.A., Barcelona-España), como agente antiséptico de referencia. Los ensayos en placa fueron incubados a 37 °C durante 18-24 horas; transcurrido este tiempo, se midió la absorbancia a 600 nm en un lector de placas de ELISA (Biotek Synergy 2, 254499, EUA). El resultado de la actividad antimicrobiana del 3-HPA se expresa como porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli*. Los ensayos de microdilución en placa se realizaron por duplicado; los resultados se presentan como valor promedio y desviación estándar expresados en porcentaje de inhibición de *E. coli* con 3-HPA.

El material, los medios de cultivo y las soluciones fueron esterilizados previamente a 120 °C durante 15 min. Todos los ensayos se realizaron en una cabina de bioseguridad clase II (Purifier Logic Labconco A2, modelo 3620804, Missouri-EUA), desinfectada con alcohol al 70% (Alcohol desnaturalizado al 96%, CTR Scientific 14468, México) y expuesta a la luz UV durante 15 minutos.

Análisis estadístico

Para evaluar el efecto del tiempo de fermentación (2, 4, 6, 8, 10 y 12 h) y del medio de cultivo (MRS comercial, MRS suplementado con 1% de glucosa y MRS suplementado con 1% de celobiosa) sobre el porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7, se utilizó un diseño factorial completamente aleatorizado. Se evaluaron tres medios de cultivo y seis tiempos de fermentación, con tres réplicas por combinación de factores, para un total de 54 experimentos.

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) de dos vías, considerando como factores el medio de cultivo, el tiempo de fermentación y su interacción. Cuando se detectaron diferencias significativas ($p < 0.05$), las medias se compararon mediante la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher, con un nivel de significancia del 5%. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Statgraphics Centurion XVI.I (Virginia-EUA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Curva de crecimiento de *E. coli* O157:H7

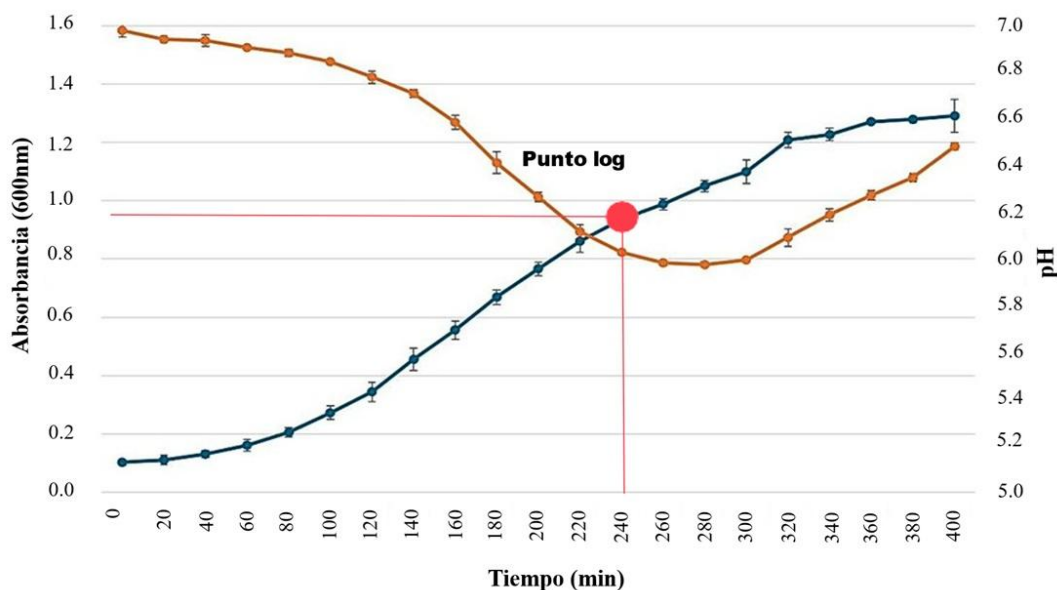


Figura 2. Curva de crecimiento de *E. coli* O157:H7 (●) y variación de pH (●). Identificación del punto logarítmico de crecimiento (●) en 240 minutos con una Ab_{600nm} de 0.936 (± 0.030). Todos los experimentos se realizaron por triplicado y los resultados se expresan como media $\pm$ desviación estándar (DE).

En la **Fig. 2** se muestra la cinética de crecimiento establecida para la bacteria patógena *E. coli* utilizada en este estudio como un referente de contaminación en alimentos y al origen de enfermedades gastrointestinales como

consecuencia. Se puede observar una fase de adaptación al medio de cultivo de entre 40-60 min, y posterior inicio de un crecimiento exponencial para alcanzar su máximo punto logarítmico de crecimiento transcurridos 240 min (4 h). Posterior a este punto, la bacteria continuó con un crecimiento con menor aceleración hasta los 400 min (6.4 h). Con lo que al pH respecta se observa claramente un comportamiento inversamente proporcional, hasta los 260 minutos. Posterior a este tiempo, el pH incrementa en paralelo al comportamiento de la curva de crecimiento. Ambos comportamientos de incremento bacteriano y en el pH puede tener su origen a las sustancias producidas durante el metabolismo de *E. coli* que la misma bacteria utiliza como alimento para sobrevivir. Finalmente, se obtuvo el tiempo de duplicación a 77.86 min (1.29 h) y la velocidad específica de crecimiento $\mu = 0.0089 \text{ h}^{-1}$.

Producción de 3-HPA y actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *L. reuteri* ATCC 55730 sobre *E. coli* O157:H7

Las concentraciones máximas de 3-HPA detectadas en los sobrenadantes de los tres medios de cultivo evaluados variaron en función del medio y del tiempo de crecimiento. En el medio MRS suplementado con 1% de celobiosa, la concentración máxima de 3-HPA fue de $1.50 \pm 0.07 \text{ mg/mL}$ a las 6 h de crecimiento. En el medio MRS suplementado con 1% de glucosa, se obtuvo una concentración máxima de $1.75 \pm 0.02 \text{ mg/mL}$ a las 8 h, mientras que en el MRS comercial se alcanzó la mayor concentración entre los tratamientos, con $2.00 \pm 0.25 \text{ mg/mL}$ a las 8 h. En el sedimento o paquete bacteriano de *L. reuteri*, la escasa concentración de 3-HPA detectada no registró actividad antimicrobiana alguna (datos no mostrados).

La actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento de *L. reuteri* dependió tanto del medio de cultivo como del tiempo de fermentación (**Fig. 3**). En el medio MRS suplementado con 1% de celobiosa (**Fig. 3A**), el mayor porcentaje de inhibición se observó a las 8 h ($45.01 \pm 18.51\%$), siendo significativamente superior al registrado a las 12 h ($p < 0.05$). Los tiempos de 2, 4, 6 y 10 h presentaron valores intermedios y compartieron grupos estadísticos con ambos extremos. En el medio MRS suplementado con 1% de glucosa (**Fig. 3B**), los porcentajes de inhibición permanecieron bajos durante todo el periodo evaluado ($3.47\text{--}12.22\%$), sin detectarse diferencias significativas entre los tiempos de fermentación ($p > 0.05$).

Por su parte, el sobrenadante obtenido en el medio MRS comercial (**Fig. 3C**) presentó su mayor actividad inhibitoria a las 6 h ($35.94 \pm 7.76\%$), la cual fue significativamente superior a la observada en los tiempos de 4, 10 y 12 h ($p < 0.05$), mientras que los tiempos de 2 y 8 h mostraron valores intermedios. La clorhexidina al 0.12%, como agente antimicrobiano de referencia (control positivo), inhibió el crecimiento de *E. coli* en un $97.61 \pm 0.05\%$ (**Fig. 3-D**), mostrando una actividad inhibitoria mayor que la observada para cualquiera de los sobrenadantes evaluados. La diferencia de inhibición de los sobrenadantes con respecto a la CHX se observa en la **Tabla II**.

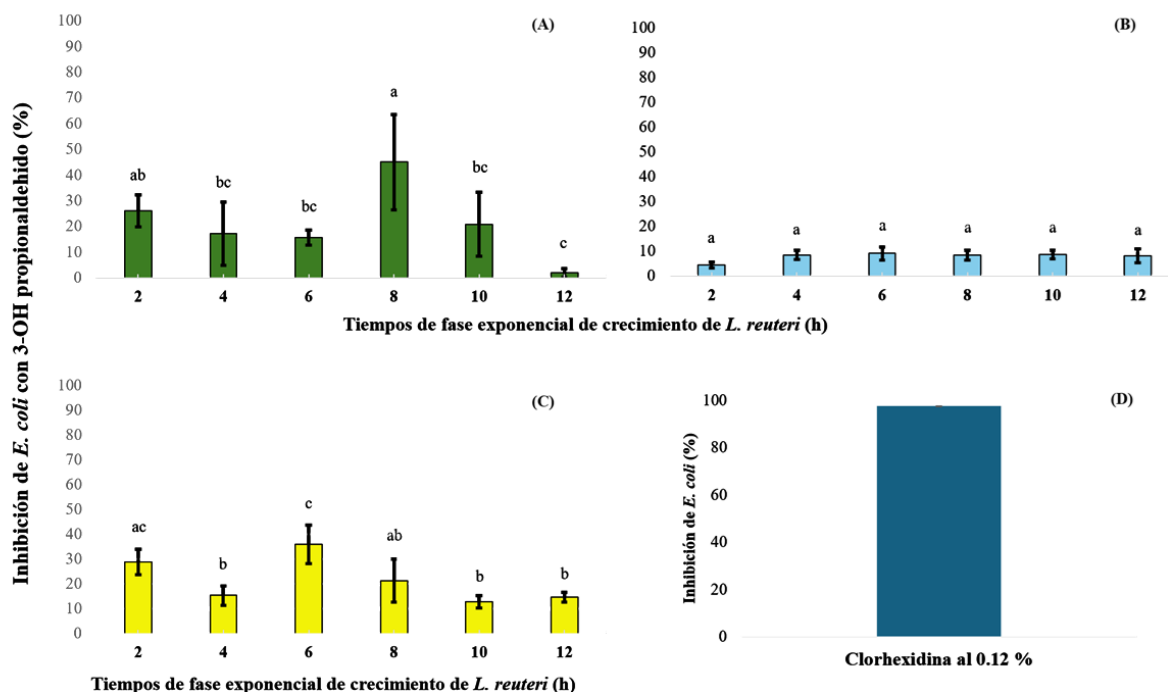


Figura 3. Representación gráfica del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 expuesta al sobrenadante de *Limosilactobacillus reuteri* con 3-hidroxipropionaldehído (3-HPA) y a la Clorhexidina, utilizada como control positivo de actividad antimicrobiana, en los tiempos de la fase exponencial (2, 4, 6, 8, 10 y 12 h). Los cultivos de *L. reuteri* se cultivaron en caldo MRS formulado con 1% de celobiosa (A), 1% de glucosa (B), en MRS de referencia (C) y, como control positivo (D), en Clorhexidina al 0,12% (Perioxidin® Lacer S.A., Barcelona-España).

Es importante destacar que la mayor actividad antimicrobiana no coincidió con la mayor concentración de 3-HPA detectada en los sobrenadantes. Mientras que el medio MRS comercial presentó la concentración máxima de 3-HPA (2.0 ± 0.25 mg/mL), el mayor porcentaje de inhibición se observó en el sobrenadante obtenido con 1% de celobiosa. Asimismo, en el medio MRS comercial la máxima actividad inhibitoria se registró a las 6 h, mientras que la mayor concentración de 3-HPA se detectó a las 8 h. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana observada no depende exclusivamente de la concentración de 3-HPA, sino que podría estar influenciada por la presencia de otros metabolitos extracelulares producidos durante el crecimiento de *L. reuteri*.

Tabla II. Diferencia de inhibición (expresada en porcentaje) de la bacteria *E. coli* expuesta a la clorhexidina al 0.12%, con respecto al efecto inhibitorio de 3-HPA, acumulado en los sobrenadantes de los cultivos MRS de *L. reuteri*.

Cultivo MRS de <i>L. reuteri</i>	Diferencia en la inhibición de <i>E. coli</i> de la CHX ¹ versus el 3-HPA	Tiempo de comparación en la fase exponencial (h)
MRS formulado con 1% de celobiosa	52.60 %	8
MRS formulado con 1% de glucosa	89.11 %	4-12
MRS de referencia (BD Difco)	61.67 %	6

¹CHX: clorhexidina al 0.12%

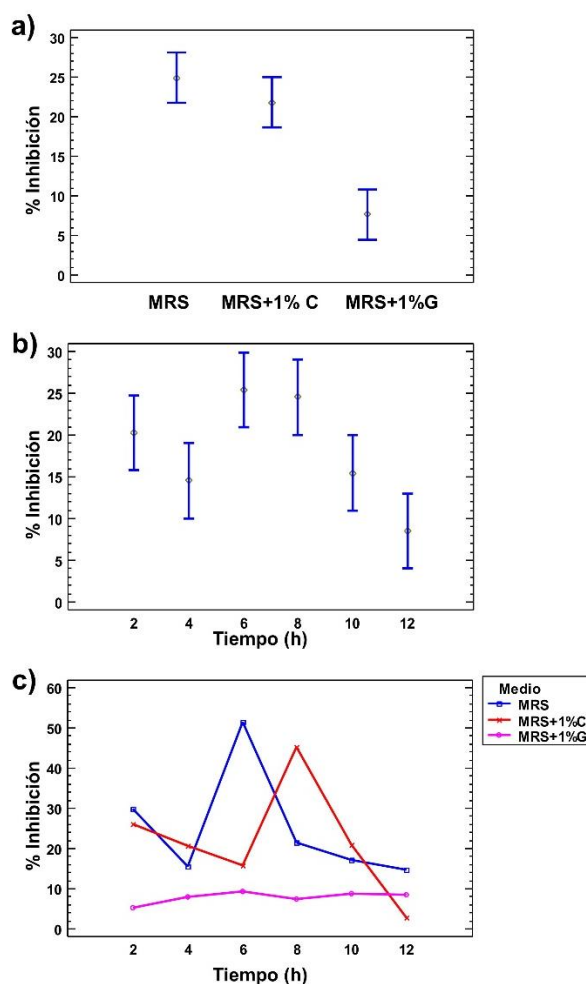


Figura 4. Análisis de varianza y LSD para (a) Medio utilizado, (b) tiempo y (c) gráfico de interacción sobre el porcentaje de inhibición de *Escherichia coli* O157:H7.

El análisis de varianza (**Fig. 4**) mostró que el medio de cultivo, el tiempo de fermentación y la interacción entre ambos factores tuvieron un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición de *E. coli* ($p < 0.05$). El análisis de comparaciones múltiples indicó que los sobrenadantes obtenidos en el medio MRS comercial y en el medio MRS suplementado con 1% de celobiosa presentaron porcentajes de inhibición significativamente mayores que aquellos obtenidos en el medio MRS suplementado con 1% de glucosa (**Fig. 4A**). Asimismo, el efecto del tiempo dependió del medio de cultivo, observándose diferencias significativas únicamente en los tratamientos con MRS comercial y MRS suplementado con 1% de celobiosa (**Fig. 3**).

De acuerdo con el ANOVA, no se observaron diferencias significativas entre el % de inhibición al utilizar MRS o MRS+1% de celobiosa, en donde ambos presentaron una diferencia significativa mayor que al utilizar medio MRS+1% de glucosa (**Fig. 4a**). Por su parte, los tiempos de 6 y 8 h presentaron una actividad inhibitoria significativamente mayor respecto a 12 h (**Fig. 4b**). Por otro lado, los tiempos de 4, 10 y 2 h mostraron valores intermedios, compartiendo grupos estadísticos con algunos de los demás tratamientos, lo que indica un comportamiento parcialmente similar entre ellos (**Fig. 4c**).

La actividad inhibitoria del 3-HPA producido en el medio MRS formulado con 1% de celobiosa fue ligeramente superior al generado en el medio MRS comercial, posiblemente debido a la represión catabólica por carbono descrita en el trabajo de Napoleon (2019), en la que la glucosa presente en el medio tradicional de crecimiento de *L. reuteri* mantiene activa la expresión de la secuencia del elemento de represión catabólica (CRE), regulando negativamente la actividad del operón *pdu*, responsable de la conversión de glicerol a 3-HPA. Otra posible explicación de este fenómeno se basa en el enlace β -(1 $\rightarrow$ 4) presente en la estructura de la celobiosa; en el estudio de Zeng et al. (2024), observaron que el crecimiento de ciertas especies de bacterias ácido-lácticas variaba según

la única fuente de carbono disponible en el medio. Y aunque en sus resultados *L. reuteri* no se encontraba entre aquellas especies que mostraron una mejora en su crecimiento cuando únicamente se encontraba la celobiosa como fuente de carbono en el medio, sí sugirieron que aquellas especies que sí se beneficiaron de esta la preferirían por la facilidad de romper este enlace al momento de metabolizarla. Además, en los estudios de Li et al. (2023), se observó que la suplementación con celobiosa en el medio de cultivo tradicional de *L. reuteri* mejoró su crecimiento, lo que podría sugerir que, en combinación con 2 fuentes de carbono, se traduciría en un incremento en el rendimiento del 3-HPA o en la estabilidad de su actividad.

El 3-HPA producido en el medio MRS formulado con 1% de glucosa presentó una actividad menor que en los otros 2 medios, posiblemente a causa de la represión catabólica por carbono (CRR), pero a una escala mucho mayor al existir únicamente glucosa como fuente de carbono, pero en una proporción menor a la que normalmente se cultiva *L. reuteri* en el medio MRS convencional que contiene 2 % de glucosa en su formulación. Existen otros estudios como el de Ko et al. (2024), donde también hacen uso del medio MRS comercial de otra marca y también con un contenido de 2% de glucosa (Difco, Detroit, MI, EE. UU.). La actividad de inhibición del 3-HPA producido en el medio MRS de referencia (BD, Becton, Dickinson and Company, Francia), sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, concuerda con los resultados de Al-Nabulsi et al. (2021) en los que su crecimiento se vio inhibido al momento de cultivarlo en presencia de la molécula. Sus porcentajes de inhibición fueron ligeramente inferiores a los observados en el medio formulado con 1% de celobiosa. Esto podría explicarse igualmente por la represión catabólica del carbono (CRR) mencionada en el trabajo de Napoleon (2019).

Se observó una alta actividad antimicrobiana en el crecimiento de *E. coli* ejercida por la clorhexidina con un porcentaje del 97.61%; Baca-Castañón et al. (2015) describieron este comportamiento en el que la clorhexidina logró inhibir eficientemente el crecimiento de distintas bacterias odontopatógenas al ser empleada como un agente antiséptico en el área odontológica.

Dado que el 3-HPA es secretado por *L. reuteri* según lo establecido por Sun et al. (2022), es coherente y esperable no haber observado actividad antimicrobiana al exponer al patógeno al sobrenadante del sedimento o al paquete bacteriano procesado de *L. reuteri*, puesto que una gran proporción del agente antimicrobiano que produjeron terminó siendo secretada en el sobrenadante.

CONCLUSIONES

La sustitución de la glucosa por celobiosa como fuente de carbono modificó la actividad antimicrobiana del 3-HPA acumulado en el sobrenadante producido por *Limosilactobacillus reuteri* ATCC 55730, frente a *Escherichia coli* O157:H7. Aunque la mayor concentración de 3-HPA se obtuvo en el medio MRS comercial, el sobrenadante procedente del medio formulado con 1% de celobiosa presentó el mayor porcentaje de inhibición bacteriana.

La falta de correspondencia entre la concentración máxima de 3-HPA y la máxima actividad antimicrobiana indica que el efecto inhibitorio del sobrenadante no puede atribuirse exclusivamente a este metabolito, lo que sugiere la participación de otros compuestos extracelulares generados durante la fermentación. En consecuencia, la actividad biológica del sobrenadante depende del perfil metabólico inducido por la fuente de carbono más que de la concentración de un único compuesto.

Desde una perspectiva biotecnológica, la celobiosa representa una fuente de carbono de interés para el desarrollo de procesos fermentativos sostenibles, ya que puede obtenerse a partir de residuos lignocelulósicos y generar sobrenadantes con elevada actividad antimicrobiana. Estos resultados respaldan su potencial aplicación en estrategias de valorización de subproductos agroindustriales como parte de los principios de la economía circular, y constituyen una base para futuros estudios dirigidos a caracterizar los metabolitos responsables de la actividad inhibitoria observada, así como al desarrollo de procesos biotecnológicos más sostenibles.

BIBLIOGRAFÍA

Al-Nabulsi, A. A., Osaili, T. M., Oqdeh, S. B., Olaimat, A. N., Jaradat, Z. W., Ayyash, M., & Holley, R. A. (2021). Antagonistic effects of *Lactobacillus reuteri* against *Escherichia coli* O157:H7 in white-

- brined cheese under different storage conditions. *Journal of Dairy Science*, 104(3), 2719–2734. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19308>
- Ali, M. S., Lee, E. B., Lim, S. K., Suk, K., & Park, S. C. (2023). Isolation and identification of *Limosilactobacillus reuteri* PSC102 and evaluation of its potential probiotic, antioxidant, and antibacterial properties. *Antioxidants*, 12(2), 238. <https://doi.org/10.3390/antiox12020238>
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 48 Suppl 1, 5–16. https://doi.org/10.1093/jac/48.suppl_1.5
- Baca-Castañón, M. L., De la Garza-Ramos, M. A., Alcázar-Pizaña, A. G., Grondin, Y., Coronado-Mendoza, A., Sánchez-Najera, R. I., Cárdenas-Estrada, E., Medina-De la Garza, C. E., & Escamilla-García, E. (2015). Antimicrobial effect of *Lactobacillus reuteri* on cariogenic bacteria *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mutans*, and periodontal diseases *Actinomyces naeslundii* and *Tannerella forsythia*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12602-014-9178-y>
- Circle, S. J., Stone, L., & Boruff, C. S. (1945). Acrolein determination by means of tryptophane. A colorimetric micromethod. *Ind Eng Chem Anal Ed* 17(4):259–262. <https://doi.org/10.1021/i560140a021>
- Cooper, G. M. (2000). *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates, *Metabolic Energy*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9903/>
- Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion In Microbiology*, 11(2), 87-93. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.02.007>
- Escherichia coli* O157:H7. American Type Culture Collection: The Global Bioresource Center. <https://www.atcc.org/products/baa-1883>
- Escamilla-García, E., Alcázar-Pizaña, A. G., Segoviano-Ramírez, J. C., Del Angel-Mosqueda, C., López-Lozano, A. P., Cárdenas-Estrada, E., De La Garza-Ramos, M. A., Medina-De La Garza, C. E., & Márquez, M. (2017). Antimicrobial activity of a cationic guanidine compound against two pathogenic oral Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2017, 5924717. <https://doi.org/10.1155/2017/5924717>
- Heng, J., Zhang, Z., Proctor, E., Tyufekchiev, M., Deskins, N. A., & Timko, M. T. (2021). Cellobiose as a model carbohydrate for predicting solubilities in nonaqueous solvents. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 60(4), 1859-1871. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.0c04963>
- Ko, H. I., Hae-Il, Y., So-Rim, K., Chae-Rim, J., Jong-Bang, E., & Tae-Woon K. (2024). Development a modified MRS medium for enhanced growth of psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from kimchi. *LWT Food Sciences and Technology*, 210(116815), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116815>.
- Lactobacillus reuteri* ATCC® 55730. American Type Culture Collection: The Global Bioresource Center. <https://www.atcc.org/products/baa-3352>
- Li, M., Wang, Y., Guo, C., Wang, S., Zheng, L., Bu, Y., & Ding, K. (2023). The claim of primacy of human gut *Bacteroides ovatus* in dietary cellobiose degradation. *Gut Microbes*, 15(1), 2227434. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2227434>
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H., & Pretorius, I. S. (2002). Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 66(3), 506–577. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002>
- Morales-Landa, J. L., Lazcano-Díaz, E., Escamilla-García, E., Pérez-De la Rosa, A. G., & Luiz-Santos, N. (2025). Comparative study of L/D lactic acid production in cultures of probiotic strains supplemented with carbohydrates from agave and other agroindustrial resources. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 9. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2025.1613809>
- Mu, Q., Tavella, V. J., & Luo, X. M. (2018). Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 9, 757. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00757>

- Napolean, C. L. J. (2019). A study of antimicrobial effects of reuterin by *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 on *Escherichia coli* [Master's thesis]. Faculty of Engineering LTH, Lund University.
<https://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordId=8996582&fileId=8996691>
- National Center for Biotechnology Information (2026a). PubChem Compound Summary for CID 5793, D-Glucose. Retrieved April 23, 2026 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/D-Glucose>.
- National Center for Biotechnology Information (2026b). PubChem Compound Summary for CID 439178, Cellobiose. Retrieved April 23, 2026 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cellobiose>.
- Nishimura, Y., Yokogawa, D., & Irle, S. (2014). Theoretical study of cellobiose hydrolysis to glucose in ionic liquids. *Chemical Physics Letters*, 603, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2014.04.014>
- Norma ISO 9001:2015. Sistema de Gestión de Calidad – Requisitos. Organización Internacional de Normalización (ISO). <https://www.iso.org/es/contents/data/standard/06/20/62085.html>
- Norma ISO 1348:2016. Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes. The International Organization for Standardization (ISO).
<https://www.iso.org/standard/59752.html>
- Ries, M. E., Radhi, A., Keating, A. S., Parker, O., & Budtova, T. (2014). Diffusion of 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate in Glucose, Cellobiose, and Cellulose Solutions. *Biomacromolecules*, 15(2), 609–617. <https://doi.org/10.1021/bm401652c>
- Schaefer, L., Auchtung, T. A., Hermans, K. E., Whitehead, D., Borhan, B., & Britton, R. A. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, 156(Pt 6), 1589–1599. <https://doi.org/10.1099/mic.0.035642-0>
- Spinler, J. K., Taweechotipatr, M., Rognerud, C. L., Ou, C. N., Tumwasorn, S., & Versalovic, J. (2008). Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14(3), 166–171.
<https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2008.02.001>
- Sun, M.-C., Hu, Z.-Y., Li, D.-D., Chen, Y.-X., Xi, J.-H., & Zhao, C.-H. (2022). Application of the reuterin system as food preservative or health-promoting agent: A critical review. *Foods*, 11(24), 4000.
<https://doi.org/10.3390/foods11244000>
- Talarico, T. L., Casas, I. A., Chung, T. C., & Dobrogosz, W. J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 32(12), 1854–1858. <https://doi.org/10.1128/aac.32.12.1854>
- Urrutia-Baca, V. H., Escamilla-García, E., de la Garza-Ramos, M. A., Tamez-Guerra, P., Gómez-Flores, R., & Urbina-Ríos, C. S. (2018). In vitro antimicrobial activity and downregulation of virulence gene expression on *Helicobacter pylori* by reuterin. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 10(2), 168–175.
<https://doi.org/10.1007/s12602-017-9342-2>
- Zeng, M., Oh, J.-H., van Pijkeren, J.-P., & Pan, X. (2024). Selective utilization of gluco-oligosaccharides by lactobacilli: A mechanism study revealing the impact of glycosidic linkages and degree of polymerization on their utilization. *Journal of Food Science*, 89(1), 523–539.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.16851>
- Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M. A. P., Harris, H. M. B., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Gänzle, M. G., & Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 70(4), 2782–2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>
- Zhang, J., Yang, X., Hou, B., Wang, A., Li, Z., Wang, H., & Zhang, T. (2014). Comparison of cellobiose and glucose transformation to ethylene glycol. *Cuihua Xuebao/Chinese Journal of Catalysis*, 35(11), 1811–1817. [https://doi.org/10.1016/s1872-2067\(14\)60151-0](https://doi.org/10.1016/s1872-2067(14)60151-0)