

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE LA MIXTECA**  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**POTENCIAL PROBIÓTICO Y PRODUCCIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS *IN VITRO* DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DEL PULQUE**

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS DE PRODUCTOS NATURALES Y ALIMENTOS**

PRESENTA:

**I.Q. YESICA RUIZ RAMÍREZ**

DIRECTOR:

**DR. ROGELIO VALADEZ BLANCO**

CODIRECTORA:

**DRA. PAULA CECILIA GUADARRAMA MENDOZA**

HUAJUAPAN DE LEÓN, OAXACA. NOVIEMBRE DE 2017

Este trabajo se realizó en las instalaciones de los Laboratorios de Productos Naturales y Alimentos de la Universidad Tecnológica de la Mixteca, bajo la dirección del Dr. Rogelio Valadez Blanco y la codirección de la Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza. Parte del trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la supervisión del Dr. Adelfo Escalante Lozada. Se contó con el apoyo de beca de manutención, número 714207/593299, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, en la modalidad de cartel, organizado por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, del 25 al 30 de junio de 2017, realizado en Puerto Vallarta, Jalisco.

El protocolo de investigación de este trabajo fue reconocido por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería con el premio Sergio Sánchez Esquivel 2017 en la categoría de maestría, el reconocimiento fue entregado en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería el 29 de junio de 2017.

A mis padres y a mi hermana, por estar siempre a mi lado.

Mamá. Mi mundo, mis problemas y mi soledad son por mucho más tolerables gracias a tu existencia, eres un ser maravilloso que siempre ha estado a mi lado, me ha brindado apoyo y consuelo en todos esos momentos de tristeza, enojo y preocupación, pero sobre todo disfrutas conmigo cada una de mis alegrías. No sé qué sería de mi vida sin ti. ¡Eres genial! ¡Te amo!

Papá. El poder de tus abrazos, de tus palabras y de tu amor es algo que no puedo explicar. Tenerte en mi vida es lo que me hace sonreír cada día. Le das a mi mundo seguridad y tranquilidad, gracias por todo lo que me has dado, por creer en mí cuando a veces ni siquiera yo lo hago, por tus regaños cuando lo merezco y por siempre estar. ¡Te amo!

Adriana. Por ser mi compañera de vida, por ser mi hermana y mi mejor terapeuta. Porque si de algo estoy profundamente orgullosa es de ti, una mujer entregada y apasionada por su profesión. Gracias por obligarme a disfrutar de la vida. Gracias por mis dos regalitos (Ixchel y Yunuén), que se han convertido en mi mayor motivación, inspiración y felicidad. ¡Los amo!

A toda mi familia: a los que aún tengo y puedo abrazar; y a todos aquellos que ahora viven en mis recuerdos, pero que permitieron que yo naciera en una familia tan maravillosa, en especial al Tío Bulmaro por recordarme lo fuerte que puedo ser y por permitirme estar con él en esos últimos momentos, lo abrazo con el alma.

A quienes me brindaron su amistad, cariño y apoyo en la UTM: Antonio, Francisco, Eunice, Erika, Yaz, Ulises, Magda, Dra. Edith, Tenoch, Greis, Elisa, Mary... Qué genial fue compartir momentos con ustedes, los llevare siempre en el corazón. ¡¡Gracias!!

En especial: a mí, por no dejarme vencer y siempre luchar por lo que quiero, por que en muchas ocasiones el principal obstáculo se encuentra dentro de uno mismo.

A mis incondicionales: a mis Padres y a mi hermana, por el amor, la confianza y el apoyo siempre. ¡Muchas Gracias!

A la Universidad Tecnológica de la Mixteca por permitirme seguir creciendo profesionalmente, de igual manera al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada.

Dr. Rogelio Valadez Blanco. Gracias por aceptarme en el laboratorio y poner en mis manos un proyecto tan valioso para usted. Gracias por la confianza, el apoyo, el cariño y por toda la enseñanza brindada. ¡Muchas gracias!

Dra. Paula Cecilia Guadarrama Mendoza. Gracias por su cariño, tiempo y apoyo para conmigo y el proyecto. ¡Muchas gracias!

Al Dr. Adelfo Escalante Lozada por introducirme al mundo de la biología molecular y por todos sus consejos. A la Dra. Mirna Patricia Santiago Gómez, el Dr. Mario Ramírez Lepe y al Dr. Raúl Salas Coronado por todas sus acertadas aportaciones al trabajo. ¡Muchas gracias!

A la M.C. Alma Yadira Salazar Govea y a la Dra. Norma Francenia Santos Sánchez por sus consejos, por animarme y por siempre recordarme las cualidades con las que cuento, porque en muchas ocasiones somos incapaces de verlas. ¡Muchas Gracias!

Antonio y Francisco. Gracias por enseñarme a sobrevivir en la UTM, por esos recorridos para conocer la universidad y por todas las aventuras dentro y fuera de clases. Porque todo fue más fácil estando con ustedes. No fue bullying, fue entrenamiento psicológico. ¡Muchas Gracias!

Son muchas las personas que han formado parte de esta etapa de mi vida a las que me gustaría agradecer su amistad, consejos, apoyo y compañía. Sin importar donde estén ¡Gracias! por formar parte de mí.

## RESUMEN

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana, no destilada, producida por la fermentación del aguamiel, que se extrae a partir de diversas especies de agave. El pulque se considera por tradición una bebida saludable y se ha usado en la medicina tradicional, sobre todo en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. Estas propiedades benéficas en la actualidad pueden explicarse por la actividad probiótica y prebiótica de los microorganismos y compuestos del pulque, respectivamente. La actividad probiótica se asocia a la presencia de una gran diversidad de bacterias ácido lácticas (BAL), destacando las pertenecientes al género *Lactobacillus*. Este grupo bacteriano también ha sido relacionado con la producción de péptidos antimicrobianos, que pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica (bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas). En este trabajo se evaluó el potencial probiótico y la producción de péptidos antimicrobianos *in vitro* de 12 cepas ácido lácticas aisladas de muestras de pulque provenientes de dos localidades del estado de Puebla y una de Oaxaca, además de la cepa *L. acidophilus* NCFM como control positivo. Todas las cepas pertenecen al género *Lactobacillus*, de las especies: *plantarum*, *brevis*, *paracasei*, *casei*, *pentosus* y *ghanensis*. Once cepas mostraron resistencia a condiciones de acidez (pH 2) y sales biliares (0.3 y 0.5%), presentando porcentajes de sobrevivencia de 61 a 88% y de 66 a 97%, en dichas pruebas, respectivamente. Además de esto, las 11 cepas mostraron actividad antimicrobiana por el ensayo de difusión en agar contra los patógenos: *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*, con halos de inhibición de 2.8 a 4 mm. Por otra parte, mediante el método de mancha en el césped y pruebas de hidrólisis con extractos enzimáticos semipurificados se determinó que ocho de las cepas con actividad antimicrobiana debían dicha actividad a la producción de péptidos antimicrobianos: pudiendo tratarse de bacteriocinas o de peptidoglucano hidrolasas. Los péptidos antimicrobianos son de importancia en el tratamiento de infecciones por microorganismos patógenos porque no generan resistencia como es el caso de los antibióticos. De las once cepas con posible potencial probiótico destacan las identificadas como *L. ghanensis* y *L. brevis*, por presentar mayor resistencia que la cepa control en las pruebas de acidez y sales biliares. En general, los resultados obtenidos en este trabajo apoyan estudios previos que asocian los beneficios del pulque a la presencia de bacterias ácido lácticas del género *Lactobacillus*. Por otra parte, es relevante hacer mención que es la primera vez que se realizan pruebas *in vitro* para la detección de péptidos antimicrobianos.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b>	VII
<b>LISTA DE TABLAS</b>	XI
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	XII
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	XIII
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE</b>	3
2.1.    El pulque	3
2.1.1.    Importancia en México	3
2.1.2.    Proceso de producción	5
2.1.3.    Microbiología del pulque	7
2.2.    Bacterias ácido lácticas	10
2.2.1.    Generalidades	10
2.2.2.    Identificación de bacterias ácido lácticas	11
2.3.    Probióticos	12
2.3.1.    Definición	12
2.3.2.    Beneficios de los probióticos a la salud humana	14
2.3.3.    Pruebas para determinar la actividad probiótica	16
2.3.3.1.    Pruebas <i>in vitro</i>	17
2.3.3.2.    Pruebas <i>in vivo</i>	18
2.3.4.    Cepas microbianas con actividad probiótica	18
2.3.5.    Potencial probiótico del pulque	21
2.4.    Microorganismos con acción antimicrobiana	23
2.4.1.    Generalidades	23
2.4.2.    Mecanismos de antibiosis	23
2.4.2.1.    Bacteriocinas	24
2.4.2.2.    Peptidoglucano hidrolasas	30
<b>3. MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS</b>	33
3.1.    Justificación	33
3.2.    Hipótesis	34

3.3.	Objetivos	34
3.3.1.	General	34
3.3.2.	Particulares	34
<b>4.</b>	<b>METODOLOGÍA</b>	<b>35</b>
4.1.	Material biológico	35
4.1.1.	Bacterias ácido lácticas	35
4.1.2.	Microorganismos patógenos modelo para la determinación del potencial probiótico	35
4.1.3.	Microorganismos sensibles a la producción de péptidos antimicrobianos	35
4.1.4.	Enzimas	36
4.2.	Almacenamiento y conservación de las cepas	36
4.3.	Resiembras de las cepas	36
4.4.	Identificación genética de las bacterias ácido lácticas	37
4.4.1.	Extracción del ADN cromosomal	37
4.4.2.	Electroforesis en gel de agarosa	39
4.4.3.	Amplificación del gen ADNr 16S por PCR	40
4.4.4.	Digestión enzimática	41
4.4.5.	Purificación del gen ADNr 16S	42
4.4.6.	Secuenciación del gen ADNr 16S	43
4.5.	Cinética de crecimiento microbiano	44
4.6.	Determinación de potencial probiótico <i>in vitro</i>	45
4.6.1.	Prueba de resistencia a pH ácido	45
4.6.2.	Prueba de resistencia a condiciones de sales biliares	46
4.6.3.	Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra bacterias patógenas	46
4.7.	Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos	47
4.7.1.	Evaluación de antibiosis por bacteriocinas	48
4.7.2.	Evaluación de actividad peptidoglucano hidrolasas	49
4.8.	Análisis estadístico	51

<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	52
5.1. Identificación genética de las bacterias ácido lácticas	52
5.2. Cinética de crecimiento microbiano	55
5.2.1. Crecimiento de las BAL	55
5.2.2. Crecimiento de los microorganismos patógenos	57
5.2.3. Crecimiento de los microorganismos indicadores	58
5.3. Determinación de potencial probiótico <i>in vitro</i>	59
5.3.1. Prueba de tolerancia a pH ácido y condiciones de sales biliares	60
5.3.1.1. Resistencia a pH ácido	60
5.3.1.2. Resistencia a sales biliares	62
5.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas	63
5.4. Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos	66
5.4.1. Evaluación de antibiosis por bacteriocinas	66
5.4.2. Evaluación de actividad peptidoglucano hidrolasas	69
<b>6. CONCLUSIONES</b>	73
<b>7. PERSPECTIVAS</b>	75
<b>8. REFERENCIAS</b>	76
<b>9. APÉNDICES</b>	86
A.1. Secuencias en formato FASTA de las bacterias ácido lácticas del pulque	86
A.2. Cinéticas de crecimiento microbiano de las bacterias ácido lácticas	89
A.3. Curva estándar de lisozima para la cuantificación de proteína por el ensayo de Bradford	91
A.4. Cinéticas de actividad peptidoglucano hidrolasas	92

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Producción de maguey pulquero en toneladas	4
<b>Tabla 2.</b>	Caracterización de la diversidad microbiana presente en muestras de pulque de tres localidades	9
<b>Tabla 3.</b>	Lista de cepas usadas en aplicaciones comerciales	20
<b>Tabla 4.</b>	Principales características de bacteriocinas y antibióticos	25
<b>Tabla 5.</b>	Mezcla de reacción para PCR utilizando la enzima <i>Taq</i> polimerasa recombinante (ThermoScientific)	40
<b>Tabla 6.</b>	Mezcla de reacción para la digestión del gen ADN <sub>r</sub> 16S	42
<b>Tabla 7.</b>	Bacterias ácido lácticas de estudio, identidad y origen	54
<b>Tabla 8.</b>	Crecimiento microbiano de los microorganismos patógenos	58
<b>Tabla 9.</b>	Crecimiento microbiano de los microorganismos indicadores para la prueba de bacteriocinas	59
<b>Tabla 10.</b>	Porcentaje de resistencia <i>in vitro</i> de las bacterias ácido lácticas del pulque a las barreras del tracto gastrointestinal	61
<b>Tabla 11.</b>	Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas de estudio contra patógenos modelo (halo de inhibición en mm)	64
<b>Tabla 12.</b>	Contenido de proteína, velocidad de reacción $(-d(DO_{450})/dt)$ y porcentaje de actividad PGH de los extractos obtenidos de las bacterias ácido lácticas	70

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Criterios que debe cumplir un microorganismo probiótico	13
<b>Figura 2.</b>	Enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal	27
<b>Figura 3.</b>	Método indirecto de detección de bacteriocinas: Mancha en el césped	28
<b>Figura 4.</b>	Ejemplo de la detección de bacteriocinas por el método de difusión en pozo	29
<b>Figura 5.</b>	Estructura del peptidoglucano (PG) y especificidad por sustrato de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs)	31
<b>Figura 6.</b>	Gel de agarosa al 1% (p/v) + 0.04% de EtBr de los productos de PCR	52
<b>Figura 7.</b>	Árbol filogenético de las secuencias identificadas y las secuencias de referencia obtenidas en el GenBank	53
<b>Figura 8.</b>	Ejemplo de las cinéticas de crecimiento	56
<b>Figura 9.</b>	Fotografías ejemplificativas del ensayo de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar para las cepas: a) B2 ( <i>L. brevis</i> ) y b) B7 ( <i>L. casei</i> )	65
<b>Figura 10.</b>	Fotografías ejemplificativas del ensayo de actividad antimicrobiana por el método de “Mancha en el césped” contra <i>L. sakei</i>	68
<b>Figura 11.</b>	Actividad lítica contra <i>Micrococcus lysodeikticus</i> durante 30 min	71

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNr 16S	Gen 16S del ARN ribosomal
Ala	Alanina
ANOVA	Análisis de varianza
APT	All-purpose with Tween®
ARNr	Ácido ribonucleico ribosómico
ATCC	American Type Culture Collection
BAL	Bacterias ácido lácticas
BHI	Brain Heart Infusion
DE	Desviación estándar
Di-A	Diaminopimérico
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DO	Densidad óptica
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ETA	Enfermedades transmitidas por los alimentos
EUA	Estados Unidos de América
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
GlcNAC	N-acetilglucosamina
Glu	Glutámico
GRAS	Generally Recognized as Safe
HCl	Ácido clorhídrico
IBT	Instituto de Biotecnología
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
MurNAc	N-acetilmurámico
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NCSU	North Carolina State University

OMS	Organización Mundial de la salud
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Peptidoglucano
PGH	Peptidoglucano hidrolasas
QPS	Qualified Presumption of Safety
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIAP	Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera
TBE	Tris-Borato-EDTA
TSAYE	Trypticase soy agar with yeast extract
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
UTM	Universidad Tecnológica de la Mixteca

## 1. INTRODUCCIÓN

El pulque es una bebida alcohólica tradicional mexicana, no destilada, producida por la fermentación de la savia (aguamiel), que se extrae a partir de diversas especies del género *Agave*, principalmente *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana* [1,2].

El aguamiel es un medio favorable para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos asociados al ambiente que rodea a la planta de maguey. A través de las interacciones entre la microbiota y el aguamiel se favorecen los procesos fermentativos que proporcionan las características finales del pulque. Además, de acuerdo a reportes en la literatura, el pulque proporciona diversos beneficios a la salud, principalmente asociados a enfermedades gastrointestinales. Estos beneficios se han atribuido a la gran variedad de bacterias ácido lácticas presentes en este producto tradicional.

En un estudio realizado por Escalante et al. [3] se reportó que el 80.97% de la microbiota del pulque pertenece a las bacterias ácido lácticas, entre las que se destacan diferentes especies de *Lactobacillus*; siendo *L. acidophilus* la más abundante. Con base en lo anterior, se han realizado varios estudios de aislamiento, caracterización y evaluación del potencial probiótico de las bacterias ácido lácticas presentes en el pulque. Arenas-Cedillo [4] realizó la evaluación de 146 cepas aisladas de muestras de pulque pertenecientes a la región Mixteca de Oaxaca. En dicho estudio se realizaron pruebas *in vitro* de resistencia a pH ácido y a sales biliares, así como de inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos. Como resultados del estudio, se reportaron 15 cepas con potencial probiótico.

Las bacterias ácido lácticas también han sido relacionado con la producción de péptidos antimicrobianos, que pueden ser utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica (bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas). Los péptidos antimicrobianos son de importancia en el tratamiento de infecciones por microorganismos patógenos porque no generan resistencia como es el caso de los antibióticos [5,6].

En el presente trabajo se determinó el potencial probiótico de cepas aisladas del pulque por medio de pruebas *in vitro*. Además, en el caso de las cepas con actividad antimicrobiana se evaluó esta actividad en función de la producción de péptidos antimicrobianos.

## 2. ANTECEDENTES Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1. El pulque

#### 2.1.1. Importancia en México

El pulque se caracteriza por ser una bebida blanca, con bajo contenido de alcohol, no clarificada, ácida y de aspecto viscoso. La producción de pulque implica tres tipos de fermentación: ácida, alcohólica y viscosa. Por lo tanto, la diversidad de microorganismos asociados es compleja dado que se compone de cultivos mixtos de bacterias y levaduras [1,2].

El pulque es considerado un ícono gastronómico y cultural mexicano, y como lo atestiguan vestigios arqueológicos es probablemente la bebida alcohólica más antigua. Los aztecas lo llamaron vino *metoctil* o de *agave* (del náhuatl *metl* = *agave* o maguey + *octli* = vino), así como *iztacoctlli* o vino blanco (de *izac*, blanco y *octli*, vino). Diferentes leyendas atribuyen el origen del pulque a la civilización Tolteca establecida en la ciudad de Tula. Sin embargo, fueron los aztecas quienes desarrollaron un pleno dominio de las técnicas de producción de aguamiel y pulque. Los aztecas establecieron las pautas morales para el consumo y el uso religioso del pulque [1,2].

Ante la caída del imperio Azteca, el pulque perdió su importancia religiosa prevaleciendo sólo como una bebida popular tradicional. Con la llegada de los españoles hubo un rápido crecimiento de las actividades productivas y comerciales del pulque, llegando a su florecimiento a finales del siglo XVIII, con el desarrollo de haciendas pulqueras. Desde 1779, la producción y comercialización de esta bebida se convirtió en una de las actividades económicas más importantes de la Nueva España [1,2].

El pulque pasó por dos etapas críticas, durante el movimiento de independencia (1810-1821) y al inicio del movimiento revolucionario (1910). Después del movimiento de independencia, la agroindustria pulquera floreció y alcanzó su mejor momento al comienzo del siglo XX, con una producción anual de 500 millones de litros de pulque obtenidos de alrededor de 140 millones de plantas de *agave*. Sin embargo, al inicio del

movimiento revolucionario factores como la inestabilidad social, la introducción de compañías cerveceras y una fuerte campaña de desprestigio llevaron al declive de la industria pulquera [1].

Actualmente, las áreas de producción de agave pulquero más importantes se encuentran en los estados centrales de México, destacando Hidalgo, Tlaxcala, Puebla, Aguascalientes, Estado de México y otros. En la Tabla 1 se muestra la producción de maguey pulquero en toneladas y porcentaje. De acuerdo al Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) en el año 2013, el estado que destaca como mayor productor de maguey pulquero es Hidalgo con un 86.7%, que junto con Tlaxcala representan el 97% de la producción del país [7].

No obstante, el pulque prácticamente ha desaparecido del mercado urbano, sólo se encuentra en pulquerías ubicadas en barrios populares de algunas ciudades importantes de la República. En las zonas rurales, el pulque sigue siendo una bebida estimulante que se asocia a la población de bajos ingresos económicos. En la actualidad, se están realizando esfuerzos importantes para conservar esta bebida ancestral mexicana; por ejemplo, el pulque se promueve en los restaurantes de comida mexicana y festivales gastronómicos [1,2].

**Tabla 1.** Producción de maguey pulquero en toneladas [7].

<b>Ubicación</b>	<b>Producción (ton)</b>	<b>Producción (%)</b>
<b>Hidalgo</b>	437,210	86.7
<b>Tlaxcala</b>	51,987	10.3
<b>Puebla</b>	5,828	1.2
<b>Aguascalientes</b>	5,355	1.1
<b>México</b>	3,123	0.6
<b>Otros</b>	862	0.2

De acuerdo a la tradición popular mexicana, el pulque ha sido considerado como una bebida saludable debido a que es una buena fuente de energía, vitaminas y

aminoácidos esenciales. Entre los aminoácidos más importantes están la lisina y el triptófano, que son generalmente insuficientes en la dieta mexicana [1,2,8]. Para los indígenas modernos Otomíes que viven en el valle del Mezquital el pulque constituye parte de la dieta básica; representando la segunda fuente de energía y la tercera fuente de proteínas. En dicha población el pulque representa la principal fuente de vitamina C, y la segunda de tiamina, riboflavina, calcio y hierro biodisponible [1]. De acuerdo a un estudio sobre el consumo de pulque en varias comunidades del Estado de México, se reporta que una ingesta diaria de 500 mL de pulque provee 215 kcal, 45% de vitamina C, 10% de niacina, 7% de tiamina, 6% de riboflavina, 15% de hierro, y cantidades adecuadas de lisina y triptófano [1,2].

Desde la época prehispánica, se asocia el consumo de pulque con diversos beneficios en la alimentación, además de sus usos en la medicina tradicional. El pulque se ha usado ampliamente en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales [1]. Actualmente, con el auge de los estudios de alimentos funcionales, estos efectos benéficos pueden explicarse por la actividad probiótica y prebiótica de los componentes del pulque. Otros beneficios asociados al consumo del pulque son el control de dispepsia, anemia, anorexia, vértigo, dolor de cabeza severo, infecciones urinarias, sífilis, así como para el incremento de producción de leche durante la lactancia, contra el fallo agudo y crónico de los riñones, entre otros [3,9].

### **2.1.2. Proceso de producción**

El proceso tradicional de producción de pulque inicia con la extracción del aguamiel, que se obtiene de diversas especies de *Agave*, principalmente *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*, y con una menor calidad de *A. altísima* y *A. lehmannii*. Las especies de agave mencionadas, crecen principalmente en suelos secos, climas fríos y altitudes entre 1800 y 2700 msnm, condiciones que favorecen la producción de un aguamiel de calidad alta. Por lo antes mencionado la zona más importante para el cultivo del maguey pulquero se localiza en los estados de Hidalgo,

Estado de México, Tlaxcala y en algunas regiones del Distrito Federal, Michoacán y Morelos [1,2].

El aguamiel se extrae de agaves maduros que han alcanzado entre 7 y 10 años de edad, y que están a punto de producir su inflorescencia (quiote). La maduración varía en función de diversos factores, como son la especie, las condiciones climatológicas y la presencia de nutrientes en el suelo [1].

Para la extracción del aguamiel se realiza una operación que se denomina castrado o capado, que consiste en retirar algunas pencas centrales del agave, y hacer una cavidad (cajete) en el tallo de la planta. El cajete se cubre con hojas de agave o con una piedra de tamaño suficiente que evite la exposición de la cavidad al medio ambiente [1,2].

Posteriormente se realiza una operación de raspado, que promueve el flujo de la savia del agave y su acumulación en la cavidad. Seguido de este proceso se inicia la recolección de aguamiel, que se realiza dos veces al día, mediante succión oral a través de un recipiente largo y oblongo denominado acocote, que consiste en el fruto seco y hueco de la planta *Lagenaria siceraria* (calabaza). El aguamiel se transfiere a contenedores, que tradicionalmente eran de piel de cabra o cerdo, y recipientes de madera; sin embargo, recientemente, se ha extendido el uso de recipientes de plástico para este fin. Después de cada recolección se repite el raspado, para evitar la regeneración de tejido del cajete. La recolección tiene una duración de 3 a 6 meses, con una producción aproximada de 1000 L de aguamiel. El volumen de producción varía a lo largo del período de cosecha, en un inicio la planta produce alrededor de 0.4 L/día, llegando a aumentar de 4 a 6 L/día [1].

El proceso de elaboración del pulque termina con la fermentación, que puede durar varias horas, dependiendo de la calidad del aguamiel, la madurez del pulque usado como inoculante, el contenido microbiano y la temporada de producción. La fermentación inicial se realiza en recipientes hechos de diferentes materiales (cuero, madera, plástico, fibra de vidrio) colocados en un cuarto denominado tinacal. Éste proceso se lleva a cabo a temperatura ambiente y dura varias semanas, dependiendo

de la temporada (desde una semana en verano hasta cuatro semanas en invierno), hasta detectar sabores alcohólicos y acéticos, y la presencia de una capa blanca de sobrenadante denominada “zurrón” [1,2].

### **2.1.3. Microbiología del pulque**

El aguamiel es un medio favorable para el crecimiento de una gran variedad de microorganismos que se asocian al ambiente que rodea la planta de maguey: las paredes del cajete, el aire, el polvo, los insectos, la cubierta del cajete y las herramientas utilizadas durante el proceso de raspado y recolección de aguamiel. A través de estas interacciones se favorece la inoculación espontánea del aguamiel y el comienzo de los diversos procesos fermentativos que conducen a la producción del pulque.

En el período de 1946-1957 Sánchez-Marroquín [1,2] realizó los primeros estudios sobre la microbiota del pulque y propuso que los microorganismos esenciales en el proceso fermentativo son las especies pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus* para las fermentaciones viscosa y ácido láctica, respectivamente y *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* para la fermentación alcohólica. Este investigador reportó que la fermentación combinada de estos microorganismos en aguamiel estéril, producía un producto final comparable en contenido de alcohol, viscosidad y acidez con el pulque tradicional. Sin embargo, estudios recientes sobre la microbiología del aguamiel y del pulque demuestran la presencia de una compleja diversidad microbiana de bacterias y levaduras [3,10].

En un estudio realizado por Escalante et al. [3] se analizaron tres muestras diferentes de pulque, provenientes de Aculco en el Estado de México, Huitzilac en Morelos y Tizayuca en Hidalgo. Por medio de un estudio filogenético se determinó que el grupo predominante de microorganismos fue el de las bacterias ácido lácticas, presentes en un 81%. Con este estudio se demostró la presencia de especies comunes y especies únicas en cada una de las tres muestras de pulque analizadas. En la Tabla 2 se

muestra la identidad de los clones secuenciados, siendo las bacterias del género *Lactobacillus* el grupo predominante. Por otra parte, las cepas reportadas anteriormente por Sánchez-Marroquín como microorganismos esenciales en la fermentación del pulque, *Leuconostoc mesenteroides* y *Z. mobilis* fueron detectados en una proporción minoritaria.

Por otro lado, Escalante et al. [10] estudiaron la dinámica de crecimiento microbiano durante la fermentación del pulque por medio del análisis de muestras del producto de fermentación, usando técnicas dependientes e independientes de cultivo. La microbiota nativa en el aguamiel estaba conformada por las especies pertenecientes al género *Leuconostoc*, *Lactococcus* y al grupo de  $\gamma$ -Proteobacterias. En el estudio al inicio de la fermentación predominaron las especies pertenecientes al género *Lactobacillus*, así como *Zymomonas mobilis*, bacterias del género *Bacillus*,  $\gamma$ -Proteobacterias-Xantomonadales y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Al avanzar el proceso de fermentación disminuyeron las poblaciones de  $\gamma$ -Proteobacterias, surgieron bacterias ácido-acéticas pertenecientes al género *Acetobacter* y se incrementaron las poblaciones de *Lactobacillus*, *Z. mobilis* y *S. cerevisiae*, las cuales predominaron hasta el final de la fermentación.

**Tabla 2.** Caracterización de la diversidad microbiana presente en muestras de pulque de tres localidades. [3]

Clones identificados	No. (%) de clones detectados en cada librería de ADNr 16S		
	Aculco	Huitzilac	Tizayuca
<b>Subdivisión <i>Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus</i></b>			
<i>Lactobacillus</i> cepa ASF360 AFI57050	87 (44.16)	107 (52.71)	51 (26.98)
<i>Lactobacillus acidophilus</i> M99740	73 (37.05)	8 (4.27)	45 (23.80)
<i>L. kéfir</i> AB024300	6 (3.04)	ND	3 (1.58)
<i>L. acetotolerans</i> M58801	2 (1.01)	ND	9 (4.76)
<i>L. hilgardii</i> M58821	ND	5 (2.67)	ND
<i>L. plantarum</i> D79210	ND	ND	1 (0.53)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> spp <i>mesenteroides</i> AB023242	16 (8.12)	1 (0.53)	47 (24.86)
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i> AB023237	ND	4 (2.13)	ND
<b>Subdivisión <i>Arthrobacter</i></b>			
<i>Microbacterium arborescens</i> AB007421	ND	ND	3(1.58)
<b>Subdivisión <i>Flexibacter-Cytophaga-Bacteroides</i></b>			
<i>Flavobacterium johnsoniae</i> M59051	ND	ND	2(1.05)
<b>Subdivisión <math>\alpha</math>-Proteobacteria</b>			
<i>Acetobacter pomorium</i> AJ001632	ND	4 (2.13)	ND
<i>Gluconobacter oxydans</i> AF127396	ND	59 (31.55)	ND
<i>Zymomonas mobilis</i> AF281034	ND	2 (1.06)	2 (1.05)
<b>Subdivisión <math>\beta</math>-Proteobacteria</b>			
<i>Hafnial alvei</i> 283203	11 (5.58)	ND	26 (13.75)

ND, No detectado.

Adicionalmente, considerando la diversidad de microorganismos presentes en el pulque, Valadez-Blanco et al. [11] realizaron un estudio para determinar las fuentes de variación en la microbiota del pulque en muestras de tres ranchos en el municipio de Tamazulapan, del Estado de Oaxaca. A partir de estos estudios, se concluyó que los perfiles microbianos entre las muestras de aguamiel de los tres ranchos, fueron muy diferentes. Por otra parte, considerando que existen muchas fuentes de variabilidad en la producción del pulque, los investigadores siguieron el perfil microbiano de aguamiel y pulque a partir de una sola planta en un período de 5 semanas, para eliminar la variabilidad de rancho a rancho. Los resultados indicaron que se lleva a cabo un proceso de fermentación desde que el aguamiel está en el cajete, lo que contribuye a que la microbiota del aguamiel no sea constante sino que cambie con el tiempo. Debido a lo anterior, los autores concluyeron que la microbiota final en el pulque también depende del tiempo de colecta del aguamiel [11].

## **2.2. Bacterias ácido lácticas**

### **2.2.1. Generalidades**

El estudio de la fermentación ácido láctica fue iniciado por Louis Pasteur entre 1857 y 1863. Diez años después en 1873 Joseph Lister obtuvo la primera cepa pura de una bacteria ácido láctica (BAL). En general, las bacterias ácido lácticas se caracterizan por ser gram-positivas, no esporuladas, catalasa negativas, aerotolerantes, ácido tolerantes y organotróficas. Este grupo de bacterias se distingue principalmente por su capacidad de llevar a cabo la fermentación de azúcares para formar ácido láctico como producto principal [12–14].

Las bacterias ácido lácticas incluyen cocos y bacilos, siendo los géneros más importantes *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, entre otros. Muchas BAL han sido clasificadas como sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) por la FDA (Food and Drug Administration) [12,13].

Recientemente, varias especies de bacterias ácido lácticas, han sido usadas en la producción y conservación de alimentos; principalmente debido a que algunas de estas especies han sido reconocidas como probióticas. Sin embargo, se ha reportado que la actividad probiótica es diferente para las diversas especies BAL [12].

### **2.2.2. Identificación de bacterias ácido lácticas**

Debido a la importancia actual de las bacterias ácido lácticas en el área de los alimentos y nutraceuticos, su identificación y caracterización es de gran interés científico y tecnológico. Se pueden llevar a cabo análisis morfológicos y pruebas bioquímicas; sin embargo, estos son ambiguos, porque más de una especie o género bacteriano puede tener características similares y crecer en ambientes iguales o parecidos. Además de esto, la identificación a nivel de especie mediante pruebas fenotípicas se considera poco confiable [15].

En la actualidad, la identificación genotípica de las cepas bacterianas se enfoca principalmente en la aplicación de métodos de biología molecular. La diferenciación de una variedad de microorganismos se ha realizado mediante análisis de restricción de la amplificación del gen ADNr 16S. Esta técnica se ha aplicado para la identificación de bacterias del género *Lactobacillus* aislados de productos lácteos, así como de muestras fecales y vaginales de seres humanos. La comparación de las secuencias con un banco especializado de datos permite obtener de manera precisa la identificación taxonómica del microorganismo aislado a nivel de género o especie [15–17].

Los ribosomas son orgánulos complejos y especializados, que sirven a los organismos para la síntesis de proteínas. El coeficiente de sedimentación del ribosoma bacteriano es de 70S, expresado en unidades Svedberg, el cual puede disociarse en dos subunidades, de 50S (grande) y 30S (pequeña). Estas subunidades son complejos ribonucleoproteicos constituidos por proteínas ribosómicas y moléculas de ARNr específicas. La subunidad 30S contiene el ARNr 16S y 21 proteínas diferentes. El ARNr 16S es un polirribonucleótido de aproximadamente 1,500 pares de bases (pb), también

denominado ADN ribosomal 16S (ADNr 16S), y es comúnmente utilizado para obtener información filogenética y taxonómica. Al analizar la secuencia de los ARNr 16S de distintos grupos filogenéticos se revela la presencia de una o más secuencias características que se denominan oligonucleótidos firma, los cuales permiten clasificar a una determinada cepa bacteriana dentro de un grupo específico. La técnica de identificación molecular basada en el análisis de gen ADNr 16S consta principalmente de tres etapas: 1) amplificación del gen, 2) determinación de la secuencia de nucleótidos y 3) análisis y comparación de la secuencia contra una base de datos de secuencias genéticas [15,18].

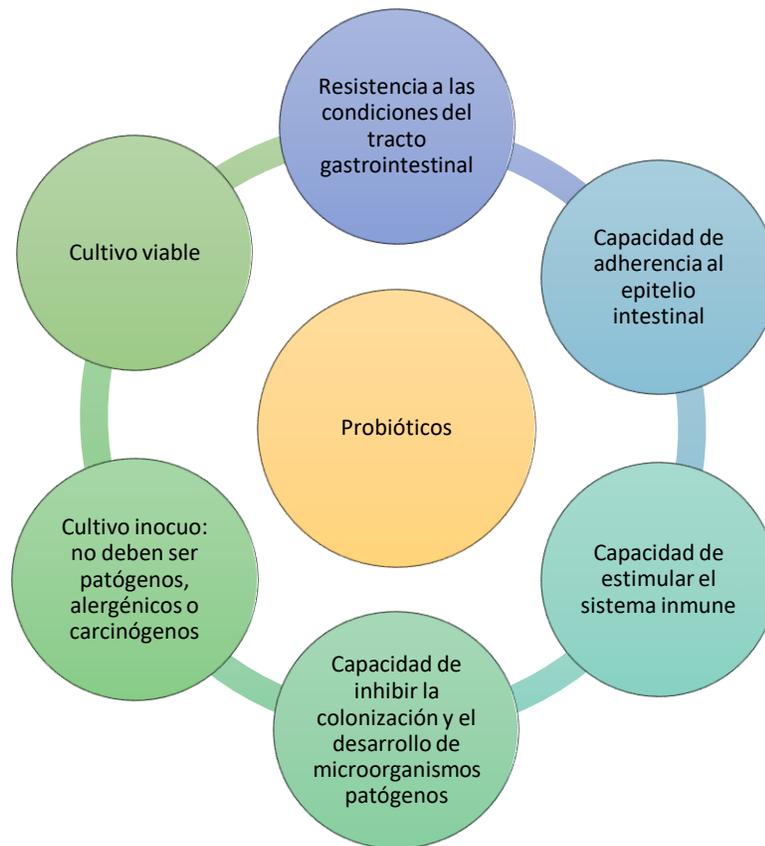
## **2.3. Probióticos**

### **2.3.1. Definición**

El término probiótico es relativamente nuevo y significa “a favor de la vida”. En la actualidad este término se utiliza para denominar a los microorganismos que causan efectos benéficos a los seres humanos y a los animales. Eli Metchnikoff [19] realizó la primera observación de la función positiva desempeñada por algunas bacterias en el ser humano, en el que afirmó que “la dependencia de los microbios intestinales con respecto a los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestro organismo y sustituir los microbios nocivos por microbios útiles”. Antes de eso, Henry Tissier [20] ya había observado que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias caracterizadas por una morfología peculiar en forma de “Y”. Tissier reportó que estas bacterias “bífidas” eran, por el contrario, abundantes en niños sanos.

Sin embargo, no fue hasta 1960 cuando se acuñó la palabra probiótico para designar a las sustancias producidas por microorganismos que promueven el crecimiento de la microbiota intestinal [21]. Muchas han sido las definiciones propuestas para el término probiótico; Fuller [22] definió el término como “un suplemento dietético a base de microbios vivos que afecta beneficiosamente al animal huésped mejorando su equilibrio intestinal”. Havenaar y Huis in 't Veld [23] lo definieron como “un monocultivo o cultivo

mixto de bacterias viables que, cuando se aplica a animales o seres humanos, afecta beneficiosamente al huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona”. Sin embargo, la definición más reciente y aceptada es la propuesta por la FAO/OMS [24]: “microorganismos vivos que, administrados en concentraciones adecuadas, pueden proveer un beneficio a la salud del hospedero”. Los microorganismos probióticos deben ser resistentes a las condiciones del tracto gastrointestinal, tener la capacidad de inhibir microorganismos patógenos, ser capaces de adherirse al epitelio intestinal, estimular el sistema inmune, ser cultivos inocuos, además de ser viables al momento de su consumo (Figura 1) [24–26].



**Figura 1.** Criterios que debe cumplir un microorganismo probiótico.

### 2.3.2. Beneficios de los probióticos a la salud humana

Actualmente, diversas cepas bien caracterizadas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* están comercialmente disponibles para reducir el riesgo de infecciones gastrointestinales o incluso tratar estas enfermedades. Entre los efectos benéficos de los probióticos se ha reportado la mejora de la salud intestinal, la estimulación y el desarrollo del sistema inmune, la síntesis y la mejora de la biodisponibilidad de los nutrientes, la reducción de síntomas de intolerancia a la lactosa y la reducción del riesgo de algunas enfermedades degenerativas como algunos cánceres [25,27,28].

El desarrollo de terapias alternativas basadas en el suministro de microorganismos probióticos está adquiriendo gran importancia debido a la rápida aparición de cepas patógenas resistentes a los antibióticos, y los efectos adversos de éstos sobre la flora intestinal. Se ha reportado que la infección frecuente por patógenos puede aumentar el riesgo de contraer enfermedades más agudas. Entre las propiedades atribuidas a los probióticos están su actividad antimicrobiana, anticancerígena, antiaterogénica, antidiabética. Asimismo se ha reportado que los probióticos tienen capacidad como mejoradores inmunológicos, productores de ácidos grasos de cadena corta y para la prevención y reducción de la obesidad [25–32].

Por otra parte, los probióticos han demostrado ser eficaces en diversas condiciones clínicas específicas, que van desde diarrea infantil, enterocolitis necrotizante, diarrea asociada a antibióticos, infecciones por *Helicobacter Pylori*, entre otras. A continuación se muestran algunos reportes de los beneficios asociados a los probióticos [21]:

- Enterocolitis necrotizante.

Es un trastorno devastador al cual está expuesto un recién nacido prematuro si se encuentra en una unidad de cuidados intensivos neonatales. La enfermedad se caracteriza por distensión abdominal, vómitos biliosos, diarrea con sangre, letargia, apnea y bradicardia. La mortalidad varía de 20 a 30% y los sobrevivientes tienen secuelas a largo plazo como síndrome del intestino corto, obstrucción intestinal y fallo multiorgánico. En bebés prematuros se han observado cantidades menores de

*Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en sus heces. Este hallazgo sugiere una correlación inversa entre las bacterias ácido lácticas y la enterocolitis necrotizante [33].

- Infecciones por *Helicobacter pylori*.

Esta bacteria es una causa importante de gastritis crónica y úlcera péptica, y además es un factor de riesgo para enfermedades malignas como el cáncer. Los tratamientos para la erradicación de *H. pylori* a base de antibióticos son 90% eficaces. Sin embargo, estos tratamientos son costosos y causan efectos secundarios, así como resistencia a los antibióticos [34].

Guetarni et al. [35] realizaron pruebas *in vitro* e *in vivo* de la actividad antimicrobiana de cepas ácido lácticas contra cepas de *H. pylori*. Para las pruebas *in vitro* los autores utilizaron el método de difusión en agar. Por otra parte, para las pruebas *in vivo* se utilizaron dos grupos de ratones que fueron inoculados por una semana con *H. pylori* TN2GF4, después de tres semanas los grupos infectados fueron tratados por 7 días con *E. faecium*. La determinación de células viables de *H. pylori* se realizó por conteo mediante una biopsia gástrica. Las cepas probióticas fueron determinadas en las heces frescas de ratones tratados mediante conteo. Los autores reportaron una inhibición significativa de *E. faecium* contra *H. pylori* en la prueba *in vitro*, por lo cual fue llevada a la prueba *in vivo*. La cepa en la prueba *in vivo* redujo la colonización *H. pylori* en el estómago con un porcentaje de 43% en una semana.

- Infecciones urogenitales.

Una microbiota anormal de la vagina predispone a una mujer a la infección vaginal o de la vejiga sintomática. Se han asociado las cepas de *Lactobacillus* GG (ATCC 53103) y *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 con la protección y colonización del tracto urogenital. El mecanismo que se ha observado es la inhibición de la adhesión de los patógenos, causada por diversos subproductos del metabolismo de los microorganismos probióticos, tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas y peróxido de hidrógeno. En este sentido, la administración de *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *L. fermentum* RC-14

vía oral como terapia para mantener y restaurar la salud urogenital ha resultado efectiva para la prevención y el tratamiento de infecciones urogenitales [36].

- Anticancerígenos.

Goldin y Gorbach [32] reportaron que la introducción de *L. acidophilus* en la dieta reduce la incidencia de tumores de colon, la prueba se realizó en ratas a las cuales se les indujo un tumor químicamente. Adicionalmente, estos autores también sugieren que una dieta apropiada puede reducir la generación de sustancias cancerígenas en el colon. El mecanismo propuesto para explicar estos efectos se basa en la inhibición de enzimas bacterianas intestinales que convierten compuestos pro-carcinógenos a agentes carcinógenos.

- Antimicrobianos.

La microbiota intestinal es un ecosistema complejo, y la introducción de nuevos organismos en este entorno altamente competitivo es difícil. Los probióticos tienen la capacidad de establecerse en el tracto gastrointestinal. En diversos estudios realizados con seres humanos y animales, se han utilizado microorganismos benéficos para mejorar la resistencia a la colonización por microorganismos patógenos de las superficies celulares. *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* producen ácido láctico como producto final de la fermentación. Además de los ácidos láctico y acético, los microorganismos probióticos pueden producir otros ácidos, tales como ácido hipúrico y cítrico. Las bacterias lácticas también producen sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas. Estas sustancias crean ambientes antagónicos para patógenos transmitidos por los alimentos [26,32].

### **2.3.3. Pruebas para determinar la actividad probiótica**

El efecto benéfico de los probióticos es producto de la interacción de mecanismos complejos que difieren para cada cepa. Estos mecanismos incluyen la competencia por sitios de unión a la pared intestinal, competencia por nutrientes, producción de sustancias antimicrobianas, estimulación de la producción de mucinas, estabilización

de la barrera intestinal, mejora del tránsito intestinal, metabolismo de nutrientes y de ácidos grasos volátiles, así como la inmunomodulación (estimulación inmune e inmunoregulación) [37].

El uso de nuevos microorganismos con potencial probiótico requiere una amplia investigación tanto de sus beneficios como de sus posibles efectos secundarios. Debido a esto, es importante que las cepas con potencial probiótico para consumo humano no sólo se sometan a pruebas *in vitro*, sino también a pruebas *in vivo*. Estas últimas pruebas se realizan en animales, y pueden ser seguidas por ensayos clínicos en humanos, con el fin de comprobar la idoneidad, seguridad y beneficios de las cepas de estudio para el consumo humano [37].

#### **2.3.3.1. Pruebas *in vitro***

Para la selección inicial de cepas con potencial probiótico se usan principalmente métodos *in vitro*. Las pruebas realizadas para evaluar el potencial probiótico de una cepa, están relacionadas con la capacidad de los microorganismos para sobrevivir y colonizar el tracto gastrointestinal. A continuación, se mencionan las principales pruebas que se utilizan para evaluar la actividad probiótica de cepas microbianas:

- Tolerancia a la acidez gástrica y sales biliares

Una característica importante que deben cumplir las bacterias probióticas es la tolerancia a las condiciones del tracto gastrointestinal. Entre estas condiciones están pH ácidos, concentraciones altas de sales biliares y variaciones de pH, que pueden afectar la viabilidad de los microorganismos y que éstos lleguen al intestino [38].

- Adhesión de los microorganismos al epitelio intestinal

La adhesión de los microorganismos al epitelio intestinal es un requisito importante para que una cepa pueda ser considerada probiótica. Esta cualidad puede reducir la adhesión de microorganismos patógenos al epitelio y también permite la colonización de la cepa probiótica a la superficie intestinal, aunque esta sea transitoria. La adhesión

bacteriana puede estar mediada por la unión de proteínas de la superficie bacteriana, tales como lectinas a oligosacáridos del tejido intestinal [39].

- Actividad inhibitoria de patógenos

Una característica importante de las cepas probióticas es la inhibición o eliminación de microorganismos patógenos, denominada actividad antimicrobiana. Generalmente las pruebas *in vitro* se realizan con microorganismos como *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) [40].

### **2.3.3.2. Pruebas *in vivo***

A pesar de que con las pruebas *in vitro* se puede predecir el potencial probiótico de ciertas cepas, para demostrar las propiedades atribuidas a agentes probióticos es necesario realizar pruebas bien establecidas en modelos animales. En las pruebas *in vivo* se toman en cuenta un mayor número de variables como la matriz del alimento, el procesamiento del microorganismo y la interacción de éste con la microbiota intestinal. Adicionalmente las pruebas *in vivo* más avanzadas involucran pruebas en humanos. Sin embargo, un inconveniente de estas pruebas es que son muy costosas y pueden requerir diversos permisos de comités de ética y de índole legal. Actualmente el modelo más utilizado para las pruebas *in vivo* son ratones, porque dado que son mamíferos, se pueden establecer varios paralelismos fisiológicos, anatómicos y metabólicos entre ellos y el ser humano [37].

### **2.3.4. Cepas microbianas con actividad probiótica**

En la actualidad existe una gran variedad de bacterias probióticas bien caracterizadas y en algunos casos ya introducidas al mercado, que se pueden encontrar en una diversa gama de productos producidos a nivel comercial (Tabla 3) [41]. La cepa probiótica con mayores reportes en la literatura es *Lactobacillus casei* Shirota, que fue aislada del intestino humano en 1930 por el Dr. Minoru Shirota. Actualmente, esta cepa se utiliza

en la producción de leche fermentada conocida comercialmente con el nombre de Yakult. Se han asociado a la cepa *Lactobacillus casei* Shirota dos beneficios principales: mantener el funcionamiento normal del tracto digestivo e inhibir el crecimiento de patógenos intestinales [42].

En un estudio realizado por Álvarez et al. [43] se administró vía oral *Lactobacillus casei* a ratones de tres semanas de edad infectados con *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados mostraron un incremento significativo en los niveles de inmunoglobulina A e inmunoglobulina M, que son producidas por el sistema inmunológico para atacar a los antígenos.

Por otra parte, Shida et al. [44] realizaron un estudio con ratones en un modelo de alergia alimentaria, administrando *Lactobacillus casei* Shirota. En éste estudio se demostró que dicha cepa disminuyó la reacción sistémica en los ratones. Los autores concluyeron que el uso de esta bacteria ayudó en la prevención de las alergias alimentarias estudiadas. En otro estudio, Waard et al. [45] administraron *L. casei* Shirota a ratas infectadas con *Listeria monocytogenes*. Los resultados mostraron un aumento en la inmunidad celular de las ratas, determinada por un retraso en la reacción de hipersensibilidad, confiriendo así resistencia contra el patógeno.

Por otra parte, la cepa comercial *Lactobacillus acidophilus* NCFM también ha sido ampliamente utilizada en alimentos convencionales (leche, yogurt y fórmulas infantiles) y suplementos dietéticos. *L. acidophilus* NCFM fue aislada y caracterizada en los laboratorios de microbiología alimentaria de la Universidad Estatal de Carolina del Norte (NCSU) por Speck y Gilliland y posteriormente estudiada por Klaenhammer. La cepa NCFM fue aislada de una fuente humana en la década de 1970 y ha sido objeto de investigaciones en la NCSU y otras instituciones alrededor del mundo [46,47].

**Tabla 3.** Lista de cepas probióticas usadas en aplicaciones comerciales. [41]

<b>Fuente/Producto</b>	<b>Cepa</b>
<b>Chr. Hansen</b>	<i>L. acidophilus</i> LA1/LA5
	<i>L. delbrueckii</i> ssp. bulgaricus Lb12
	<i>L. paracasei</i> CRL431
<b>Danisco</b>	<i>L. acidophilus</i> NCFMs
	<i>L. acidophilus</i> La
	<i>L. paracasei</i> Lpc
<b>DSM food specialties</b>	<i>L. acidophilus</i> LAFTIs L10
	<i>B. lactis</i> LAFTIs B94
	<i>L. paracasei</i> LAFTIs L26
<b>Nestle</b>	<i>L. johnsonii</i> La1
<b>Snow Brand Milk</b>	<i>L. acidophilus</i> SBT-20621
	Products Co. Ltd.
	<i>B. longum</i> SBT-29281
<b>Institute Rosell</b>	<i>L. rhamnosus</i> R0011
	<i>L. acidophilus</i> R0052
<b>Yakult</b>	<i>L. casei</i> Shirota
	<i>B. breve strain</i> Yaku
<b>Foneterra</b>	<i>B. lactis</i> HN019 (DR10)
	<i>L. rhamnosus</i> HN001 (DR20)
<b>Probi AB</b>	<i>L. plantarum</i> 299V
	<i>L. rhamnosus</i> 271
<b>Danone</b>	<i>L. casei</i> immunitas
	<i>B. animalis</i> DN173010 (Bioactiva)
<b>Essum AB</b>	<i>L. rhamnosus</i> LB21
	<i>Lactococcus lactis</i> L1A
<b>Biogaia</b>	<i>L. reuteri</i> SD2112
<b>Morinaga Milk Industry Co. Ltd.</b>	<i>B. longum</i> BB536
<b>Lacteol Laboratory</b>	<i>L. acidophilus</i> LB
<b>Medipharm</b>	<i>L. paracasei</i> F19

*L. acidophilus* se encuentra comercialmente disponible desde mediados de 1970 por ser considerada una bacteria segura, con facilidad de manejo comercial y por su posible funcionalidad probiótica en humanos [47]. Gilliland et al. [48] reportaron que en pruebas *in vitro* *L. acidophilus* NCFM mostró capacidad para eliminar colesterol de un medio de cultivo. Adicionalmente, en el mismo estudio los autores reportaron la capacidad de la cepa NCFM para reducir el colesterol en presencia de bilis y ausencia de oxígeno, ambas condiciones presentes en el tracto intestinal.

Otro beneficio que se atribuye a la cepa *L. acidophilus* es ayudar a evitar la intolerancia a la lactosa, trastorno que puede resultar en problemas intestinales y se hace presente por la falta de la enzima lactasa. Se ha demostrado en varios estudios que los productos lácteos fermentados aumentan la tolerancia a la lactosa. Esta observación se ha atribuido en parte a la capacidad de las bacterias ácido lácticas para servir como fuente de lactasa en el intestino delgado, contribuyendo a la hidrólisis de lactosa en el individuo [47]. Sanders et al [49] reportaron que la actividad de la lactasa de la cepa NCFM en una base de unidades formadora de colonias es de 4.43  $\mu\text{g}$  de  $\sigma$ -nitrofenol x  $10^7$  UFC/min, que se encuentra en el límite más alto de la actividad reportada para otras cepas de *Lactobacillus* (entre 0.01 y 4.73  $\mu\text{g}$  de  $\sigma$ -nitrofenol x  $10^7$  UFC/min).

### **2.3.5. Potencial probiótico del pulque**

De acuerdo a reportes en la literatura en el pulque suelen estar presentes BAL con posible actividad probiótica [50,51]. Para corroborar que las BAL presentes en el pulque poseen actividad probiótica, se han realizado diversos estudios, basados principalmente en pruebas *in vitro*.

En un estudio en el que se aislaron BAL de pulque de Huitzilac (Morelos, México), Escalante et al. [50] seleccionaron la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 para evaluar sus propiedades probióticas *in vitro* e *in vivo*. En este estudio se realizaron ensayos *in vitro* de resistencia a condiciones extremas asociadas con el tracto gastrointestinal humano (lisozima, pH ácido y sales biliares) y ensayos de actividad antimicrobiana contra patógenos relacionados a infecciones causadas por alimentos.

Los autores reportaron que después de exponer la cepa *Leuconostoc mesenteroides* a una concentración de 100 mg/L de lisozima durante 30 y 120 min se obtuvo una sobrevivencia de las células de 90 y 71%, respectivamente. En el ensayo de resistencia a pH ácido (pH de 2.5 durante 24 h a 37°C) los autores reportaron una sobrevivencia celular del 75%, mayor que la sobrevivencia presentada por la cepa comercial probiótica *L. casei* Shirota (48%). Por otra parte, los autores reportaron que después de someter la cepa a dos concentraciones de sales biliares (0.3 y 1%) durante 24 h a 37°C, *Leuconostoc mesenteroides* presentó una sobrevivencia del 100%. Adicionalmente, en los ensayos antimicrobianos *in vitro*, la cepa mostró actividad antagonista contra *E. coli* Enteropatógena, *L. monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovars Typhi y Thyphimurium.

En el mismo estudio, se realizó un ensayo *in vivo* en 18 ratones hembras y machos de ocho semanas de edad, en el que se les administró oralmente a los ratones una dosis de  $2 \times 10^9$  UFC/día de *Leuconostoc mesenteroides* resuspendida en buffer (pH 7.2) durante 7 días. Al octavo día, se les administró una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC de *S. enterica* Typhimurium L1334 (str<sup>r</sup>) utilizando una sonda gástrica. Los autores reportaron que la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 fue capaz de disminuir la infección del patógeno en al menos un ciclo logarítmico durante un período de 3 días.

En otro estudio similar, Castro-Rodríguez et al. [51] determinaron las propiedades probióticas de 4 cepas de *Leuconostoc mesenteroides* aisladas de aguamiel de *Agave salmiana* de Nopaltepec (Estado de México). Los investigadores realizaron ensayos *in vitro* de resistencia a condiciones del tracto gastrointestinal (pH ácido y sales biliares), pruebas de adhesión a la pared intestinal, así como pruebas de actividad antagonista contra patógenos. Los autores reportaron que en la evaluación de resistencia a una condición de pH ácido (pH de 2 durante 3 h a 37 °C), las cepas de *Leuconostoc mesenteroides* tuvieron porcentajes de sobrevivencia de 40 a 50%. En el caso de la resistencia a sales biliares (0.5% durante 4 h a 37 °C) los autores reportaron porcentajes de sobrevivencia del 88 al 90%. En el mismo estudio, los autores evaluaron la adhesión de las cepas a la pared intestinal utilizando el tejido intestinal de ratas Wistar macho de 3 meses, obteniendo porcentajes de adhesión del 79 al 83%. En el

ensayo de actividad antimicrobiana, los autores reportaron que las cepas mostraron actividad contra los patógenos *E. coli* ATCC43895, *S. enterica* ATCC 14028 y *L. monocytogenes* ATCC 19115.

## **2.4. Microorganismos con acción antimicrobiana**

### **2.4.1. Generalidades**

En 1928 Alexander Fleming descubrió la penicilina, hecho que constituye uno de los mayores avances científicos y médicos del siglo XX. La penicilina junto a otros antibióticos descubiertos años después han salvado incontables vidas humanas de enfermedades infecciosas que se pensaba eran incurables. Sin embargo, el uso inadecuado de los antibióticos ha dado lugar a la aparición de bacterias resistentes, lo que actualmente es considerado como un gran problema de salud pública [52].

La resistencia de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus enterococci* a metilicina y vancomicina, respectivamente, se convirtieron en problemas graves de salud, no sólo por la patogenicidad de estos microorganismos, sino también porque estas cepas pueden transferir sus genes de resistencia a otras bacterias. Por lo anterior, resulta muy importante realizar investigaciones encausadas al descubrimiento de nuevos compuestos antimicrobianos que no provoquen resistencia bacteriana [52]. En este sentido en diversos estudios en la literatura, se ha reportado el uso de microorganismos benéficos para prevenir la colonización de microorganismos patógenos en diferentes tejidos del cuerpo humano, como el tracto gastrointestinal, el urogenital y el respiratorio [32].

### **2.4.2. Mecanismos de antibiosis**

Se ha demostrado que algunos microorganismos específicos poseen actividad inhibitoria hacia el crecimiento de microorganismos patógenos, tales como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella* y otros. Los mecanismos de acción

antibacteriana pueden ser distintos. El mecanismo indirecto consiste en la estimulación de la respuesta inmune del ser humano mientras que el mecanismo directo involucra la producción de sustancias antibacterianas, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos [37,53].

Los mecanismos de inhibición de los microorganismos patógenos más relevantes incluyen los siguientes [21,54]:

- a) Ácidos orgánicos secretados por los microorganismos probióticos que pueden bajar el pH intestinal a un nivel que no es tolerado por los patógenos.
- b) Competencia por lugares de colonización.
- c) Secreción de proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana por parte de bacterias ácido lácticas. Estos pueden ser bacteriocinas o enzimas hidrolasas, destacando entre estas últimas, las enzimas peptidoglucano hidrolasas.

El interés principal de este trabajo se enfoca en el mecanismo de antibiosis por péptidos antimicrobianos secretados por los microorganismos benéficos. Los péptidos antimicrobianos son componentes intrínsecos del sistema inmune y son producidos por un gran número de organismos como mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos. La capacidad de estos compuestos naturales para inhibir o inactivar bacterias patógenas ha elevado el interés en estas sustancias para su uso en aplicaciones terapéuticas y farmacológicas [5,6]. En cuanto a su estructura química, los péptidos antimicrobianos varían en tamaño, carga y carácter hidrofóbico. Algunos de estos péptidos no poseen estructura definida, mientras que otros adoptan estructuras secundarias o terciarias específicas [55].

#### **2.4.2.1. Bacteriocinas**

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados ribosomalmente, producidos por bacterias que inhiben el crecimiento de cepas bacterianas similares o relacionadas genéticamente. En el año de 1925 André Gratia descubrió por primera vez la actividad antimicrobiana contra *E. coli* de una bacteriocina, la colicina producida por

*Escherichia coli* V [56]. En 1969 la FAO/OMS aprobó la primera bacteriocina para ser usada como conservador de alimentos, denominada nisina, la cual es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*. Fue hasta 1988 cuando la FDA (Food and Drug Administration) aprobó en Estados Unidos el uso de nisina como un aditivo en productos enlatados contra el crecimiento del patógeno *Clostridium botulinum* [52].

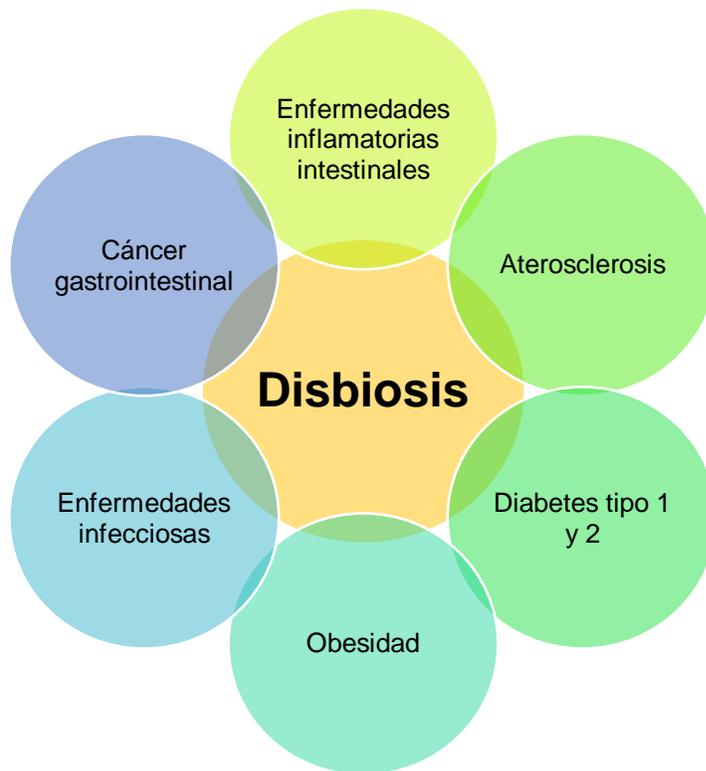
Las bacteriocinas pueden ser bactericidas (eliminar ciertas bacterias) o bacteriostáticas (inhibir el crecimiento de bacterias). La gran mayoría de las bacteriocinas son producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) que se presentan en numerosos alimentos fermentados y no fermentados. Se han caracterizado bioquímica y genéticamente un gran número de bacteriocinas [52,57–59].

**Tabla 4.** Principales características de bacteriocinas y antibióticos. [58]

<b>Características</b>	<b>Bacteriocinas</b>	<b>Antibióticos</b>
<b>Aplicación</b>	Alimentación / Clínica	Clínica
<b>Síntesis</b>	Ribosómica	Metabolitos secundarios
<b>Espectro de actividad</b>	Estrecho	Amplio
<b>Inmunidad del productor</b>	Sí	No
<b>Mecanismo de resistencia</b>	Por lo general, la adaptación relacionada con la composición de la membrana	Por lo general, modificación genética
<b>Degradabilidad proteolítica</b>	Alto	Bajo
<b>Modo de acción</b>	Formación de poros en la célula, biosíntesis de la pared celular	Membrana celular u objetivo intracelular
<b>Toxicidad hacia las células eucariotas</b>	No conocido	Sí

Las bacteriocinas suelen confundirse con antibióticos, lo que ha limitado su uso en alimentos desde el punto de vista legal. Las principales diferencias entre antibióticos y bacteriocinas están en el mecanismo de biosíntesis, el modo de acción, el espectro antimicrobiano, la toxicidad y los mecanismos de resistencia. Entre estas diferencias, se destaca que las bacteriocinas restringen su actividad a cepas de especies relacionadas con la especie que las produce. Por el contrario los antibióticos tienen un espectro de actividad más amplio, e incluso en el caso de antibióticos de espectro limitado, estas sustancias no muestran especificidad sobre cepas relacionadas. Adicionalmente, las bacteriocinas son sintetizadas ribosomalmente y se producen durante el metabolismo primario, mientras que los antibióticos son generalmente productos del metabolismo secundario de los microorganismos productores (Tabla 4) [57,58,60].

Una de las principales ventajas de las bacteriocinas es que no causan resistencia como lo hacen los antibióticos lo que en la mayoría de los casos conduce a una disbiosis intestinal. La disbiosis es un desequilibrio de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal o la expansión de nuevos grupos bacterianos dentro de esta. La microbiota intestinal puede ser vista como un órgano corporal que contribuye al bienestar del organismo huésped. Los microorganismos que colonizan el tracto gastrointestinal influyen en procesos como la transformación de nutrientes, el suministro de vitaminas, la comunicación intestino-cerebro, entre otros. La función adecuada de la microbiota intestinal se basa en una composición celular estable, que en el caso de la microbiota humana se compone principalmente de bacterias de los filos Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacterias y en menor cantidad Protobacterias. Actualmente, un gran número de enfermedades se asocian con la disbiosis intestinal, como las enfermedades inflamatorias, trastornos metabólicos, enfermedades autoinmunes y los trastornos neurológicos (Figura 2) [61,62].



**Figura 2.** Enfermedades asociadas a la disbiosis intestinal [61].

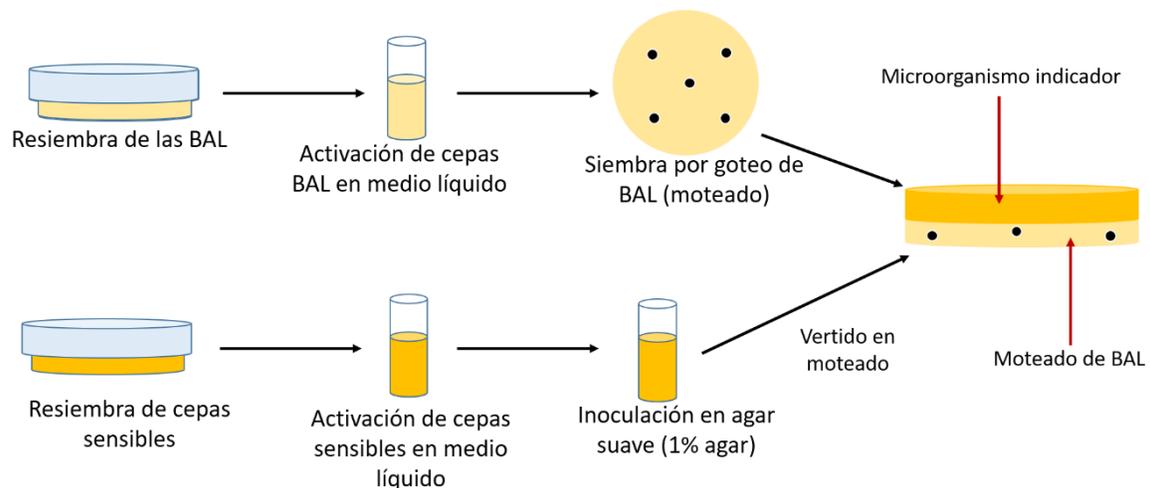
Las bacteriocinas se clasifican generalmente en 3 grupos [57,59]:

- Clase I o lantibióticos. Son péptidos pequeños (<5 kDa), típicamente tienen de 19 hasta 50 residuos de aminoácidos. Se caracterizan por tener aminoácidos inusuales, tales como lantionina, metil-lantionina, deshidrobutirina y deshidroalanina. Se subdividen en subclase 1a y 1b. En la subclase 1a se encuentra la nisina que está formada de péptidos hidrofóbicos y catiónicos y tiene una estructura más flexible en comparación con la subclase 1b. En la subclase 1b se agrupan péptidos globulares.
- Clase II o no lantibióticos. Abarca péptidos pequeños termoestables (<10 kDa). Estas bacteriocinas son catiónicas, de carácter anfifílico/hidrofóbico y carecen de los aminoácidos característicos de los lantibióticos. Actúan en la membrana celular, en la cual pueden aumentar su permeabilidad, disipar su potencial o formar canales y poros. Se subdividen en cuatro grupos, subclase IIa (con región

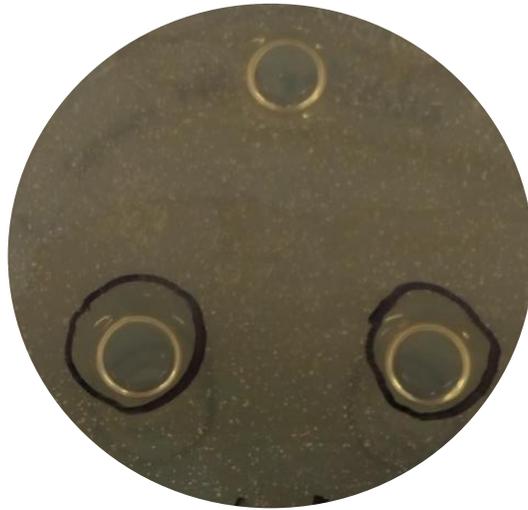
N-terminal altamente conservada), subclase IIb (dipeptídicas), subclase IIc (circulares) y subclase II d (carentes de péptidos líderes).

- Clase III. Péptidos con pesos moleculares grandes (>30 kDa), no termoestables. En esta clase sólo se encuentran dos bacteriocinas, la helveticina I, producida por *L. helveticus* y la caseicina 80, producida por *L. casei*.

Las técnicas utilizadas para la detección de bacteriocinas son muy diversas. Muchas de éstas están basadas en la difusión de bacteriocinas a través de un medio de cultivo sólido o semisólido para inhibir el crecimiento de un microorganismo sensible. Los métodos indirectos incluyen el ensayo “Flip-streak” y “Mancha en el césped”. En este último (Figura 3), la bacteria productora de bacteriocina se siembra en un medio de agar y posteriormente, un “césped” de bacterias sensibles se vierte sobre la colonia resultante. Un método más directo es el ensayo “Difusión en pozo” (Figura 4). En este ensayo, se utilizan sobrenadantes de la cepa productora de bacteriocinas. En una placa con agar específico se siembra un microorganismo sensible y se hacen pozos en él. Posteriormente, el sobrenadante de la cepa de estudio se introduce en los pozos y se evalúa su efecto en el crecimiento del microorganismo sensible [63,64].



**Figura 3.** Método indirecto de detección de bacteriocinas: Mancha en el césped.



**Figura 4.** Ejemplo de la detección de bacteriocinas por el método de difusión en pozo. Halo de inhibición del sobrenadante de *L. acidophilus* NCFM® en contra de *L. sakei* (cepa sensible a bacteriocinas).

En los métodos descritos, la formación de halos de inhibición alrededor del microorganismo indicador, indica un resultado positivo a la prueba. Asimismo, dichos métodos requieren la realización de pruebas con enzimas proteasas para asegurar la naturaleza peptídica de los compuestos antimicrobianos. De acuerdo a los reportes en la literatura, el método de “Mancha en el césped” es el más rápido y fácil de implementar. Adicionalmente se ha reportado que este método proporciona la mayor reproducibilidad en los resultados con bacteriocinas bien caracterizadas [63]. Sin embargo, los resultados positivos que se puedan observar con cualquiera de los métodos no son concluyentes para bacteriocinas, puesto que la actividad observada puede ser causada por otros compuestos de naturaleza peptídica secretados por las cepas de estudio (e.g., enzimas peptidoglucano hidrolasas).

Técnicas avanzadas en la detección de bacteriocinas consisten en la purificación de los péptidos y la posterior determinación de pesos moleculares por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Asimismo se puede realizar la secuenciación de los aminoácidos presentes y con ello determinar la estructura primaria de las bacteriocinas [65,66].

#### **2.4.2.2. Peptidoglucano hidrolasas**

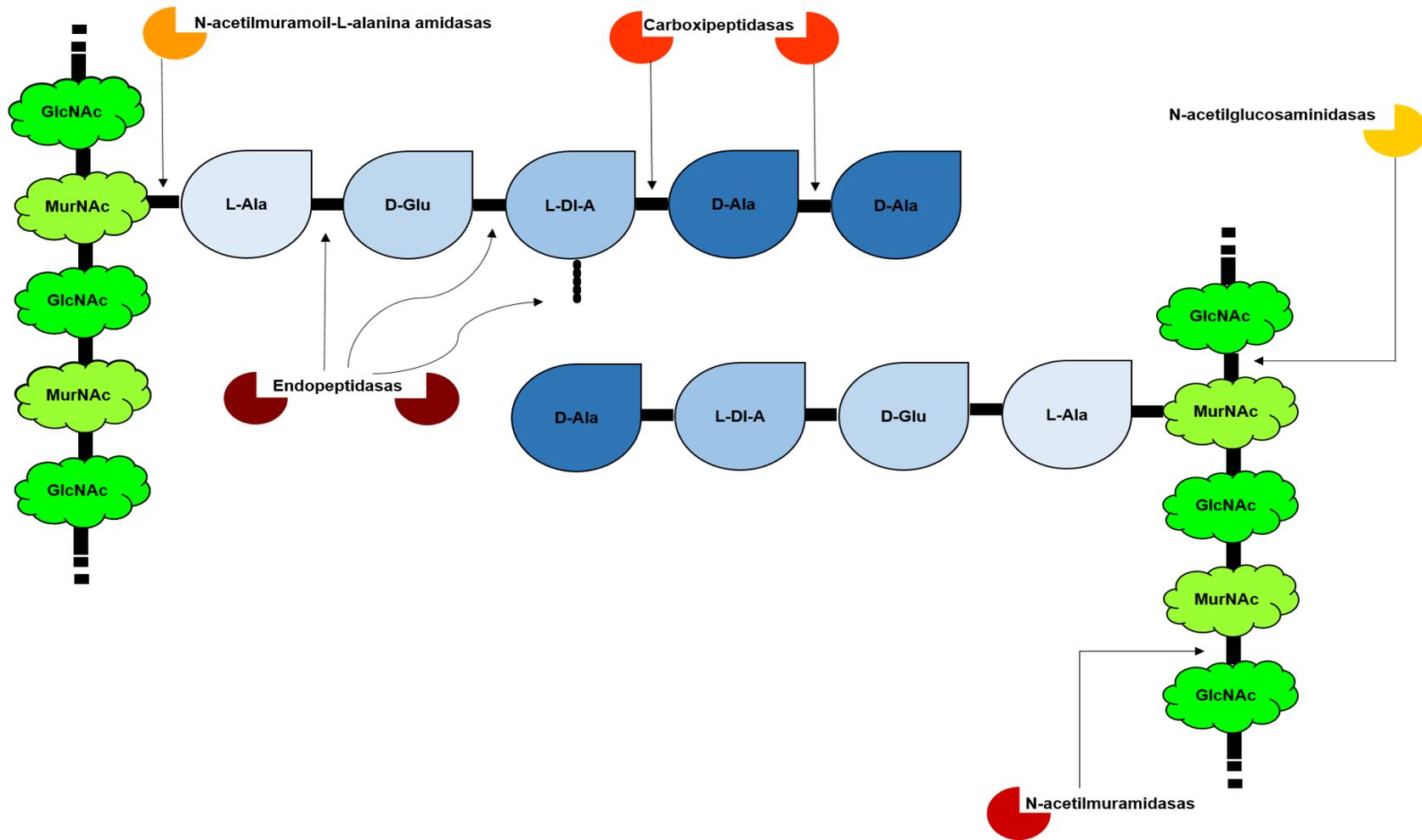
En el reino bacteriano, prácticamente todas las especies poseen una red celular de peptidoglucano (PG), que proporciona resistencia y rigidez a la pared celular bacteriana. El PG consiste en cadenas alternadas de residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc) unidos mediante enlaces  $\beta$ -1,4, que se entrecruzan por péptidos cortos formados por L y D aminoácidos. Los genomas de las especies Gram-negativas y Gram-positivas todas codifican para una amplia variedad de enzimas hidrolasas responsables de la escisión específica de diferentes enlaces de PG [67,68].

Las enzimas hidrolasas están implicadas en varias funciones críticas, incluyendo la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división, así como la autólisis. La síntesis de hidrolasas generalmente se induce en condiciones adversas de la célula, como el caso de la falta de nutrientes [67,68].

Las peptidoglucano hidrolasas (PGHs) son enzimas que hidrolizan el peptidoglucano. Existe una PGHs para escindir cada enlace del peptidoglucano (Figura 5), aunque estas hidrolasas no son necesariamente sintetizadas por la misma especie. La asignación de una función particular a una PGH presente en un microorganismo puede complicarse, por el hecho de que se pueden encontrar en el mismo un gran número de hidrolasas con funciones similares, y que una PGH puede tener actividad enzimática para hidrolizar más de un tipo de enlace [67,69].

Las PGHs se pueden clasificar principalmente en dos clases (Figura 5) [69]:

Clase 1. Las glicosidasas, rompen la cadena principal del glicano. Estas se subdividen en N-acetilglucosamidasa que hidroliza los residuos de GlcNAc a partir de residuos de azúcar adyacentes; y N-acetilmuramidasa que provoca la escisión del enlace glicosídico  $\beta$ -1,4 entre los residuos de PG MurNAc y GlcNAc.



**Figura 5.** Estructura del peptidoglucano (PG) y especificidad por sustrato de las peptidoglucano hidrolasas (PGHs). Los péptidos típicos mostrados en la figura son: L-alanina (L-Ala), D-glutámico (D-Glu), meso-diaminopimélico (L-Di-A) y D-Alanina (D-Ala) (Basado en: [70]).

Clase 2. Las amidasas o peptidasas, rompen la cadena lateral del péptido. Las amidasas se subdividen en las siguientes hidrolasas: N-acetilmuramil-L-alanina amidasa que provocan la escisión de la cadena lateral del péptido fuera de la cadena de glicano mediante la hidrólisis de la unión entre MurNAc y el residuo de L-alanina; endopeptidasas que hidrolizan enlaces amida entre dos aminoácidos dentro de la cadena peptídica; y finalmente las carboxipeptidasas que rompen el aminoácido terminal de la cadena peptídica.

Las PGHs tienen pesos moleculares que van desde los 27 kDa en el caso de la lisostafina hasta los 137 kDa para la proteína Atl. Algunas PGHs se han utilizado como agentes antibacterianos; por ejemplo, la lisostafina es una endopeptidasa que hidroliza los enlaces glicina-glicina de la pared celular de *S. aureus* [54].

Las peptidoglucano hidrolasas se han propuesto como una alternativa potencial para la sustitución de antibióticos debido a su actividad bacteriolítica de amplio espectro. Las propiedades antimicrobianas de la PGH se conocen desde hace varias décadas; por ejemplo, la eficacia de la lisozima se ha demostrado en el tratamiento de infecciones en la piel y en la membrana mucosa, así como ingrediente en ungüentos utilizados para la cicatrización de heridas. Por otra parte, se han reportado diversas aplicaciones de las PGHs como agentes antimicrobianos, principalmente en aplicaciones clínicas [68].

La detección de la actividad de PGHs, no requiere necesariamente que las enzimas estén puras. La identificación puede ser posible a partir de extractos crudos o semipuros del medio extracelular. Las PGHs desempeñan diferentes funciones en la célula, lo que hace posible encontrarlas en cualquier fase de crecimiento. Sin embargo, dado que una función importante que desempeñan las PGH es la autólisis de acuerdo a reportes de la literatura, es al finalizar la etapa de crecimiento exponencial cuando se sintetizan estas enzimas en mayor cantidad [54]. Para la caracterización y purificación de estas enzimas se utilizan las técnicas antes descritas para bacteriocinas.

### **3. MARCO CONCEPTUAL DE LA TESIS**

#### **3.1. Justificación**

El pulque es una bebida tradicional mexicana que existe desde los tiempos prehispánicos y actualmente su mayor consumo se da en poblaciones rurales. De acuerdo a reportes de la literatura esta bebida proporciona diversos beneficios a la salud. Se ha asociado el consumo de esta bebida principalmente a la prevención y cura de enfermedades gastrointestinales, lo que se atribuye actualmente a la presencia de una gran variedad de bacterias ácido lácticas en esta bebida.

En la última década, ha habido gran interés científico y tecnológico en el estudio y desarrollo de productos probióticos, debido a las diferentes propiedades benéficas que se les atribuye. Uno de los beneficios más importantes de estos productos es su actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos relacionados con infecciones transmitidas por alimentos. Generalmente, estas infecciones son tratadas con antibióticos; sin embargo, éstos no siempre son efectivos, puesto que algunos microorganismos patógenos han desarrollado resistencia. Adicionalmente, la baja especificidad de los antibióticos para actuar sobre los microorganismos patógenos causa un desequilibrio anormal general en la microbiota intestinal que se conoce como disbiosis. Por lo anterior, la búsqueda de nuevas cepas con potencial probiótico es de gran relevancia, ya que podrían representar una alternativa al uso de antibióticos.

La actividad antimicrobiana de los probióticos se atribuye principalmente a diversas sustancias secretadas por los microorganismos, como son ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo y péptidos antimicrobianos (bacteriocinas y enzimas hidrolasas). Considerando que el pulque puede contener gran variedad de bacterias ácido lácticas, este producto puede ser considerado como una nueva fuente de microorganismos probióticos. En este sentido, los resultados de este trabajo pueden contribuir a proporcionarle un valor agregado al pulque y con ello al resurgimiento de su comercialización. Adicionalmente, la identificación de cepas con actividad antimicrobiana debida a péptidos puede ser de gran importancia en la industria de

alimentos, ya que los péptidos aislados pueden utilizarse como conservadores naturales de alimentos.

### **3.2. Hipótesis**

La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas aisladas a partir del pulque es debida a la producción de péptidos antimicrobianos.

### **3.3. Objetivos**

#### **3.3.1. General**

Evaluar el potencial probiótico y determinar la producción de péptidos antimicrobianos *in vitro* de bacterias ácido lácticas aisladas del pulque.

#### **3.3.2. Particulares**

- Identificar mediante el análisis de la secuencia del gen ADNr 16S las bacterias ácido lácticas aisladas de pulque.
- Evaluar la resistencia de las bacterias ácido lácticas (BAL) a condiciones de pH ácido y presencia de sales biliares.
- Determinar la capacidad de las bacterias ácido lácticas de estudio para eliminar o inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos asociados a los alimentos.
- Evaluar el mecanismo de antibiosis por péptidos antimicrobianos de las bacterias ácido lácticas estudiadas.

## 4. METODOLOGÍA

### 4.1. Material biológico

#### 4.1.1. Bacterias ácido lácticas

Se trabajó con 12 bacterias ácido lácticas provenientes de tres fuentes diferentes de pulque: i) Cinco bacterias ácido lácticas previamente aisladas e identificadas a partir de pulque de Tamazulapan del Progreso, Oaxaca [4,11]. ii) Dos cepas aisladas e identificadas en el trabajo colaborativo del grupo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos de la UTM y del grupo del Dr. Escalante del Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM. Estas cepas se aislaron a partir de muestras de pulque obtenido de un proceso por lote alimentado secuencialmente de aguamiel proveniente de San Jerónimo Zoyatitlanapan perteneciente al municipio de Juan N. Méndez, Puebla. iii) Cinco cepas aisladas en el grupo de investigación del Laboratorio de Bioprocesos de nuestra Universidad a partir de pulque proveniente de Santa Catarina Oztolotepec, Tehuacán, Puebla. Cabe mencionar, que estas cepas fueron identificadas genéticamente en este trabajo como se describe en la Sección 4.4.

#### 4.1.2. Microorganismos patógenos modelo para la determinación del potencial probiótico

Para las pruebas de actividad antimicrobiana se usaron las siguientes cepas de microorganismos patógenos: *Salmonella typhi*, *Listeria monocytogenes* y *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). Las cepas fueron generosamente proporcionadas por el Dr. Escalante del IBT.

#### 4.1.3. Microorganismos sensibles a la producción de péptidos antimicrobianos

Para las pruebas de determinación de producción de péptidos antimicrobianos se utilizaron las siguientes cepas sensibles a bacteriocinas: *Listeria monocytogenes*,

proporcionada por el Dr. Escalante del IBT; y *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 comprada a la ATCC (EUA). Por otro lado, se utilizó la cepa *Micrococcus lysodeikticus* (*Micrococcus luteus*) ATCC 4698 (Sigma-Aldrich, EUA) como microorganismo sensible a la presencia de peptidoglucano hidrolasas.

#### **4.1.4. Enzimas**

Para confirmar la naturaleza peptídica de las sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) se utilizaron las siguientes proteasas (Sigma-Aldrich, EUA): proteinasa K (origen: *Tritirachium album*), proteasa tipo XIV (origen: *Streptomyces griseus*),  $\alpha$ -quimotripsina tipo II (origen: páncreas de bovino), pepsina (origen: mucosa de estómago de porcino) y tripsina tipo XIII (origen: páncreas de bovino). Para la evaluación de peptidoglucano hidrolasa se utilizó la enzima lisozima (Sigma-Aldrich, EUA) como enzima de referencia; la cual proviene de clara de huevo de gallina.

#### **4.2. Almacenamiento y conservación de las cepas**

Las cepas bacterianas usadas en este trabajo (bacterias ácido lácticas, patógenos modelo y microorganismos sensibles a péptidos antimicrobianos) se conservaron en cajas Petri en condiciones de refrigeración ( $4^{\circ}\text{C} \leq T \leq 5^{\circ}\text{C}$ ), realizándose resiembras por lo menos cada dos semanas. También se conservaron muestras de cada una de las cepas en congelación ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) en una solución con 30% de glicerol.

#### **4.3. Resiembras de las cepas**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) provenientes de refrigeración, se activaron en tubos con 9 mL de caldo MRS (Man, Rogosa y Sharpe) y se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 24 h bajo condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se realizó la siembra por estriado en cajas con aproximadamente 15 mL de agar MRS, y se incubaron bajo las mismas condiciones que los tubos. La confirmación de la cepa se hizo con base a la morfología

colonial y características microscópicas. La activación de las BAL se realizó cada vez que era requerido para garantizar la viabilidad de las cepas en las pruebas realizadas en este trabajo.

Para la activación de los microorganismos patógenos e indicadores se usaron diferentes medios líquidos: Infusión Cerebro Corazón (BHI, por sus siglas en inglés) para *Listeria monocytogenes*; MRS para *L. sakei*; y Caldo Nutritivo para *Escherichia coli* y *Salmonella typhi*. Después de inocular una asada de la cepa patógena en 9 mL del caldo correspondiente, los tubos se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente se efectuó la siembra por estriado en el agar correspondiente, y las cajas se incubaron a 37°C durante 24 h.

#### **4.4. Identificación genética de las bacterias ácido lácticas [3]**

La identificación genética se realizó a las cepas provenientes de pulque de Santa Catarina Otzolotepec, Tehuacán, Puebla, empleando la técnica de comparación de la secuencia del gen ADNr 16S. Esta actividad se llevó a cabo en el Laboratorio de Ingeniería Metabólica y en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

##### **4.4.1. Extracción del ADN cromosomal**

Se empleó el kit de extracción Ultra Clean™ – Microbial DNA isolation kit (MO BIO Laboratories Inc., EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. En un tubo colector de 2 mL se colocaron 1.8 mL de BAL crecidas en caldo por 24 h. El tubo se centrifugó a 10,000 x *g* por 30 s a temperatura ambiente, después de lo cual se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 300 µL de solución Microbead y la suspensión se agitó en un vortex. La solución Microbead contiene un buffer y sales que ayudan a estabilizar y dispersar homogéneamente las bacterias antes de la lisis celular.

Posteriormente, la mezcla se transfirió a un tubo Microbead y se adicionaron 50  $\mu$ L de solución MD1. Esta solución contiene un detergente aniónico, SDS, que rompe ácidos grasos y lípidos asociados a la membrana celular de los microorganismos. El tubo Microbead se agitó con un vortex durante 10 min a la velocidad máxima, colocando el tubo en forma horizontal para asegurar una lisis adecuada de las células. La agitación permite crear las condiciones químico-mecánicas para promover la lisis celular y liberar los ácidos nucleicos de las células. Posteriormente, el tubo se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s a temperatura ambiente. Este proceso permite que los restos celulares se depositen en el fondo del tubo, mientras que el ADN permanezca en el sobrenadante.

Después de esto el sobrenadante se transfirió a un tubo colector limpio de 2 mL y se agregaron 100  $\mu$ L de solución MD2, seguido de lo cual se agitó con el vortex durante 5 s. Posteriormente, el tubo se incubó a 4 °C durante 5 min. La solución MD2 permite la precipitación del material orgánico e inorgánico distinto del ADN presentes en la solución, incluyendo restos celulares y proteínas.

Pasado el tiempo de incubación, el tubo se centrifugó a 10,000 x *g* durante 1 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió cuidadosamente a un segundo tubo colector. Se agregaron 900  $\mu$ L de la solución MD3 al sobrenadante y la mezcla se agitó con el vortex durante 5 s. El líquido MD3 es una solución salina altamente concentrada que causa que el ADN se retenga en los filtros de membrana. Posteriormente, se vertieron 700  $\mu$ L de la mezcla en el filtro de membrana y el tubo se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s a temperatura ambiente. Después de esto, se retiró el sobrenadante y se cargó el resto de la mezcla. Finalmente el tubo se centrifugó nuevamente empleando las mismas condiciones, después de lo cual el sobrenadante fue descartado.

En seguida de esto, se agregaron 300  $\mu$ L de la solución MD4 y se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s a temperatura ambiente. La solución MD4 contiene etanol que sirve para limpiar el ADN retenido en la membrana, removiendo residuos de sal y otros contaminantes. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se realizó una segunda centrifugación para remover los restos de la solución MD4 del filtro de membrana.

Después de esto, el filtro de membrana se colocó en un nuevo tubo colector de 2 mL y se agregaron 50  $\mu$ L de solución MD5 en el centro del filtro. La mezcla se centrifugó a 10,000 x *g* durante 30 s. Por último, el filtro fue desechado y se obtuvo el ADN cromosomal. La solución MD5 es un buffer de Tris 10 mM con pH de 8 que ayuda a la remoción del ADN de la membrana del filtro.

#### **4.4.2. Electroforesis en gel de agarosa**

Las muestras de ADN cromosomal se sometieron a electroforesis en gel de agarosa para evaluar si el proceso de extracción del ADN se llevó a cabo de la manera correcta. Se preparó un gel de agarosa al 1% disolviendo 1 g de agarosa en 100 mL de buffer TBE de electroforesis. La mezcla se calentó hasta la disolución total de la agarosa. Después de un ligero enfriamiento, se tomaron de 35 a 40 mL del gel y se le agregaron 4  $\mu$ L de bromuro de etidio (agente revelador).

Posteriormente, en la cubeta de electroforesis se colocaron los topes, se vertió el gel y se colocó la peineta que forma los pocillos para las muestras. Se dejó gelificar durante 20 min. Una vez obtenido el gel, se retiraron los topes y la peineta, y se agregó buffer TBE a la cubeta hasta cubrir el gel. Para cargar los pozos, se mezclaron 2  $\mu$ L de la muestra con 2  $\mu$ L de colorante de carga y la mezcla se depositó sobre el pocillo del gel.

Por otra parte, para calcular el tamaño aproximado del ADN analizado, en un pocillo se cargó la mezcla de 2  $\mu$ L del colorante de carga con 1.5  $\mu$ L del marcador de peso molecular (GeneRuler™ de 1 kb DNA Ladder, Fermentas, EUA) que está compuesto por fragmentos de ADN de peso conocido. Posteriormente, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se corrió la electroforesis a 100 V durante 40 min aproximadamente, o hasta que el frente del colorante alcanzó las dos terceras partes del gel. Para el revelado del gel se empleó un fotodocumentador BIO-RAD Molecular Imager Gel Doc™ XR + Imaging System. El gel se retiró cuidadosamente con el uso de guantes de látex y se colocó en la cámara de revelado del equipo. Para el análisis de los geles las bandas de la muestra se compararon contra el patrón de bandeo del marcador.

#### 4.4.3. Amplificación del gen ADNr 16S por PCR.

La mezcla de reacción para la amplificación del gen ADNr 16S por PCR (polymerase chain reaction) se preparó usando la enzima *Taq* Polimerasa recombinante (ThermoScientific, EUA). En la Tabla 5 se muestra la composición de la mezcla de reacción. El par de primers utilizados fueron descritos por Weisburg et al. [71] los cuales permiten la obtención de un amplicón de 1.5 kb:

- fD1: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
- rD1: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

**Tabla 5.** Mezcla de reacción para PCR utilizando la enzima *Taq* Polimerasa recombinante (ThermoScientific, USA).

Reactivo	Volumen ( $\mu$ L)
10X <i>Taq</i> Buffer	5
dNTP Mix	1
Forward <i>primer</i> (fD1) (10 $\mu$ M)	2.5
Reverse <i>primer</i> (rD1) (10 $\mu$ M)	2.5
MgCl <sub>2</sub>	2
<i>Taq</i> DNA Polimerasa	1
Muestra de ADN	1
H <sub>2</sub> O	35
<b>Total</b>	<b>50</b>

Se preparó una mezcla para 6 reacciones sin agregar la muestra de ADN (master mix), colocando al final la enzima. Posteriormente, se transfirieron 49  $\mu$ L de la mezcla a microtubos para PCR y se agregó la muestra de ADN. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó un termociclador Bio-Rad C1000 que es un equipo especializado para

proveer las condiciones adecuadas de la reacción de PCR. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: desnaturalización inicial (95 °C, 5 min), amplificación (95 °C, 1 min; 42 °C, 1 min; 72 °C, 1.5 min x 30 ciclos) y amplificación final a 72 °C por 5 min. El producto amplificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia única de fragmentos de 1.5 kb (peso del gen ADNr 16S).

#### **4.4.4. Digestión enzimática**

La digestión enzimática del gen ADNr 16S se emplea para evaluar si distintas muestras de microorganismos pertenecen a una misma especie. Para esta evaluación, después de la digestión se realiza la electroforesis de las muestras digeridas y se observa el patrón de bandeo. Si el patrón de bandeo de dos muestras es similar, el microorganismo analizado es el mismo; si por el contrario, se observan distintos patrones de bandeo, entonces cabe la posibilidad de que las cepas pertenezcan a diferentes especies.

La digestión enzimática se realiza con una enzima de restricción, la cual lleva a cabo la ruptura específica y controlada del ADN. La enzima que se utilizó para la digestión del gen ADNr 16S fue la *HAE* III #R0108 (New England, BioLabs Inc., EUA). De igual manera que con la enzima *Taq* polimerasa, la enzima *HAE* III requiere de una formulación específica para llevar a cabo la reacción. En la Tabla 6 se muestra la composición de la mezcla de reacción para la digestión enzimática.

Se preparó la mezcla para 6 reacciones. Se transfirieron 15 µL de la mezcla en tubos Eppendorf de 0.5 mL y se agregaron 5 µL de ADN, después de lo cual los tubos se incubaron a 37 °C durante 1 h. La mezcla digerida se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2%, considerando que los fragmentos obtenidos son mucho más pequeños que en el caso del análisis del ADN cromosomal. La electroforesis se corrió a 70 V durante 40 min.

**Tabla 6.** Mezcla de reacción para la digestión del gen ADNr 16S.

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
<b>Buffer 10X (R)</b>	2
<b>Enzima HAE III</b>	0.125
<b>H<sub>2</sub>O</b>	12.875
<b>ADN</b>	5
<b>Total</b>	20

#### **4.4.5. Purificación del gen ADNr 16S**

Los productos de la reacción de PCR se purificaron para llevar a cabo la secuenciación del gen. Se utilizó el kit de purificación GeneJet™ PCR Purification Kit, #K0702 TC (Fermentas, EUA), siguiendo las indicaciones del fabricante. La muestra se mezcló con la solución *Binding buffer* en una relación de volúmenes 1:1. Dado que se tenían 50  $\mu\text{L}$  de productos de PCR, se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de la solución y la mezcla se agitó en el vortex. La mezcla se transfirió a una columna de purificación GeneJet, la cual fue centrifugada durante 1 min a 10,000 x *g* a temperatura ambiente; después de lo cual el sobrenadante fue desechado. Posteriormente, para la purificación del ADN retenido en la columna de purificación se agregaron a la columna 700  $\mu\text{L}$  del buffer de lavado y se centrifugó a 10,000 x *g* durante 1 min a temperatura ambiente; después, el sobrenadante fue desechado. A continuación, la columna de purificación se colocó en un tubo Eppendorf nuevo de 2.5 mL, posteriormente se le agregaron a la columna 50  $\mu\text{L}$  del buffer de elución previamente calentado a 65 °C. Por último, se centrifugó la columna a 10,000 x *g* durante 1 min a temperatura ambiente, finalmente se colectó el sobrenadante con el ADNr 16S purificado.

La cantidad de ADN en la muestra purificada se cuantificó empleando el equipo NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA) que es un espectrofotómetro a micro escala.

El equipo se calibró con 1.5  $\mu$ L de agua ultrapura. Posteriormente, se depositaron 1.5  $\mu$ L del producto de PCR purificado y se determinó la concentración de ácidos nucleicos.

#### **4.4.6. Secuenciación del gen ADNr 16S.**

La secuenciación del gen ADNr 16S de las cepas de identidad desconocida se llevó a cabo en el Departamento de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para ello, se prepararon dos mezclas de reacción, una con el *primer* fD1 y otra con el *primer* rD1. La formulación utilizada fue de 120 ng de producto de PCR con 1  $\mu$ L de *primer* (10  $\mu$ M), aforado a 16  $\mu$ L.

Se obtuvieron dos secuencias, la fD1 y la rD1 en dos archivos distintos, los cuales se analizaron en el software Finch TV (Finch TV, versión 1.4.0, Geospiza Inc.) para obtener las secuencias en el formato FASTA. El formato FASTA se utiliza para representar las secuencias usando códigos de una sola letra para obtener la sucesión de nucleótidos. A partir del formato FASTA de las dos secuencias (fD1 y rD1) se obtuvieron las secuencias completas del gen ADNr 16S de cada cepa en un procesador de texto (Microsoft Office Word®).

Las secuencias completas se compararon contra la base de datos del NCBI utilizando el programa online Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias completas se copiaron del procesador de textos y se pegaron en el programa de la base de datos. El banco de datos arrojó el género, especie y subespecie de la secuencia ingresada, y el porcentaje de ajuste de la secuencia ingresada con las secuencias de la base de datos.

Finalmente, las secuencias de estudio y las secuencias obtenidas en la base de datos se ingresaron en el formato FASTA al software MEGA 7.0.21 con el cual se construyó el árbol filogenético utilizando el método Neighbour-Joining.

#### 4.5. Cinética de crecimiento microbiano

Para el monitoreo del crecimiento microbiano, se tomó una asada de una colonia de cepa BAL con 24 h de crecimiento y se inoculó en un matraz que contenía 50 mL de caldo MRS. Posteriormente, los matraces se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante un periodo de 48 h. Se tomaron muestras del cultivo cada 4 h y se realizó el conteo de los microorganismos viables en las muestras (UFC/mL), por el método de extensión en placa. De esta forma se determinó el tiempo de cultivo al cual se alcanzaba la concentración celular que se fijó como objetivo para la determinación del potencial probiótico de las BAL:  $10^8$ - $10^9$  UFC/mL [41]. Adicionalmente, las cinéticas de crecimiento microbiano sirvieron para determinar la fase de crecimiento logarítmico de las BAL. De acuerdo a la literatura, en esta etapa de crecimiento las BAL secretan los compuestos peptídicos antimicrobianos [72,73].

Por otra parte, para el caso de los microorganismos patógenos utilizados en la prueba antimicrobiana se buscaron concentraciones de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. Se realizó el monitoreo del crecimiento microbiano de los patógenos cada 24 h. Se tomó una asada de una colonia de la cepa patógena con 24 h de crecimiento, y se inoculó en un tubo que contenía 9 mL de caldo BHI o caldo nutritivo. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 48 h. Para la cuantificación de la biomasa presente en los cultivos se realizó el conteo por extensión en placa de microorganismos viables (UFC/mL) en las muestras de cultivo.

Para el caso de los microorganismos indicadores, *Listeria monocytogenes* y *L. sakei*, utilizados en las pruebas de producción de bacteriocinas se fijó una concentración de  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL. De una caja recién sembrada de las cepas indicadoras (24 h), se tomó una asada del inóculo y se colocó en un tubo con 12 mL de caldo BHI (para *Listeria monocytogenes*) o MRS (para *L. sakei*). Subsecuentemente, los tubos se incubaron a 37 °C en condiciones de microaerofilia durante 48 h. Se realizó el conteo en placa de microorganismos viables (UFC/mL) a diferentes diluciones a intervalos de 12 h. En el caso de *Micrococcus luteus*, no se realizó el conteo microbiano debido a

que este microorganismo fue usado para el ensayo de actividad peptidoglucano hidrolasa como un sustrato enzimático en forma no viable.

#### **4.6. Determinación de potencial probiótico *in vitro***

Se evaluó el potencial probiótico de las 12 cepas ácido lácticas de estudio y se utilizó como control positivo a la cepa comercial *Lactobacillus acidophilus* NCFM®. Las BAL aisladas de pulque proveniente de Tamazulapan del Progreso, Oaxaca, fueron evaluadas previamente por su potencial probiótico *in vitro* [4]; sin embargo, a diferencia de la investigación realizada en este trabajo, en dicho estudio, las pruebas de acidez y sales biliares fueron evaluadas de manera conjunta, y la prueba antimicrobiana fue únicamente cualitativa. A continuación se describe la metodología seguida para cada una de las pruebas.

##### **4.6.1. Prueba de resistencia a pH ácido [50,74,75]**

A partir de una caja recién sembrada de la cepa BAL de estudio (24 h), se tomó una asada de una colonia y se inoculó en un tubo con 9 mL de caldo MRS. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente se tomó 1 mL del inóculo y se colocó en un tubo que contenía 9 mL de caldo MRS ajustado a un pH de 2 (usando HCl 5N). Como blanco se inoculó un tubo con caldo MRS sin acidificar (pH 6.5). Los tubos inoculados en caldo MRS acidificado y el blanco (sin acidificar), se incubaron durante 3 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia.

Posteriormente, se evaluó la resistencia a la condición de acidez mediante el conteo microbiano en placa de diluciones seriadas de los cultivos de prueba por duplicado. El conteo de colonias viables (UFC/mL) se realizó por el método de extensión en placa usando 100 µL de inóculo. Se realizaron dos experimentos independientes del ensayo. El porcentaje de sobrevivencia se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{C_{pH}}{CI} * 100$$

donde:

CpH = Conteo de células viables después de la exposición a acidez (UFC/mL).

CI = Conteo de células viables después de 20 h de crecimiento sin ajuste del medio (UFC/mL).

#### **4.6.2. Prueba de resistencia a condiciones de sales biliares [50,74,75]**

Se hicieron crecer las BAL en placa durante 24 h y se sembraron por asada en tubos con 9 mL de caldo MRS. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 20 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, 1 mL del cultivo inicial se resuspendió en 9 mL de caldo MRS bajo diferentes concentraciones de sales biliares: 0.0% (blanco), 0.3% y 0.5%. Los tubos se incubaron durante 24 h a 37 °C en condiciones de microaerofilia. La evaluación de la resistencia de las BAL de estudio a la presencia de sales biliares se realizó como se describió anteriormente para la prueba de resistencia a pH ácido. El porcentaje de sobrevivencia se calculó con la fórmula siguiente:

$$\% \text{ de sobrevivencia} = \frac{CSB}{CI} * 100$$

donde:

CSB = Conteo de células viables después de la exposición a sales biliares (UFC/mL).

CI = Conteo de células viables después de 20 h de crecimiento sin ajuste del medio (UFC/mL).

#### **4.6.3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra bacterias patógenas [76]**

La evaluación de la actividad antimicrobiana se realizó utilizando la técnica de difusión en agar. Se cultivaron los microorganismos patógenos en placa durante 24 h y se sembraron por asada en medios de cultivo líquido, utilizando los medios originales de cada cepa. El medio que se utilizó para *L. monocytogenes* fue BHI; mientras que para

*E. coli* y *S. typhi* fue caldo nutritivo. Las cepas se incubaron durante 24 h a 37 °C. Posteriormente se inoculó 1 mL del microorganismo patógeno en 10 mL de agar APT en forma líquida a una temperatura de aproximadamente 45 °C; después de lo cual, la mezcla se homogenizó y se vertió en placa dejando solidificar. Las cajas fueron incubadas a 37 °C por 24 h. Por otra parte, las cepas ácido lácticas se cultivaron en placa durante 24 h, después de lo cual, se inoculó una asada en 9 mL de caldo MRS. Los medios se incubaron a 37 °C por 20 h en condiciones de microaerofilia.

Para la preparación de la prueba de difusión en agar se utilizaron discos de papel filtro estériles de 4 mm de diámetro. Se colocaron tres discos, de manera bien espaciada y distribuida, en cada una de las cajas de agar APT inoculadas previamente con las cepas patógenas. En cada ensayo a dos de los discos se les agregó 20 µL de la cepa BAL de estudio y al disco restante (blanco) se le agregó 20 µL de agua destilada estéril. Las cajas se incubaron sin ser invertidas a 37 °C en condiciones de microaerofilia. Se realizaron dos replicas por tratamiento. Después de 20 h de incubación se realizó la medición del halo de inhibición con la fórmula siguiente:

$$H_i = \frac{(D_T - D_D)}{2}$$

donde:

$H_i$  = Halo de inhibición en mm.

$D_T$  = Diámetro total (diámetro del disco + halo de inhibición) en mm

$D_D$  = Diámetro del disco (4 mm)

#### **4.7. Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos**

Se evaluó la producción de péptidos antimicrobianos en las cepas que presentaron actividad antimicrobiana en la sección anterior. El mecanismo de actividad antimicrobiana que se evaluó fue la producción de péptidos antimicrobianos: bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.

#### 4.7.1. Evaluación de antibiosis por bacteriocinas [63,77]

Las BAL de estudio se cultivaron en placa durante 24 h y se sembraron por asada en tubos con 9 mL de caldo MRS. Los tubos se incubaron a 37 °C durante 18 h. Posteriormente, se sembraron por moteado 2 µL de la BAL (fase de crecimiento logarítmico) en una caja con medio Agar Soya Tripticasa sin glucosa más 0.5% de extracto de levadura (TSAYE, por sus siglas en inglés). Las cajas sin invertir se incubaron a 37 °C en microaerofilia hasta que se observó el crecimiento de las colonias (aproximadamente 18 h). La incubación en condiciones anaerobias y el uso de TSAYE sin glucosa descarta la posibilidad de inhibición por peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos, respectivamente. Por otra parte, se inoculó la cepa indicadora (fase de crecimiento logarítmico) en agar suave (1% de agar) BHI (*L. monocytogenes*) o MRS (*L. sakei*) en forma líquida atemperado a aproximadamente 42 °C. El volumen total de agar suave con el indicador fue de 8 mL con una concentración celular de  $10^5$  a  $10^6$  UFC/mL.

Para determinar la producción de bacteriocinas, la suspensión de agar suave (BHI o MRS) inoculada con la cepa indicadora se vertió en la caja de agar TSAYE cultivada previamente con la cepa BAL de prueba. Una vez solidificado el medio, las cajas se incubaron a 37 °C durante 18 h en condiciones de microaerofilia. Para el análisis de la prueba, la presencia de una zona clara alrededor de la colonia de la BAL (halo de inhibición), se consideró como un indicador positivo de la actividad inhibitoria de la BAL de prueba.

Las cepas con actividad inhibitoria contra los microorganismos sensibles a las bacteriocinas fueron subsecuentemente estudiadas, para corroborar la naturaleza peptídica de las sustancias antimicrobianas, mediante pruebas de hidrólisis con proteasas específicas. Para este ensayo, se sembraron por moteado 2 µL de BAL (fase de crecimiento logarítmico) en medio agar TSAYE y se incubó a 37 °C en microaerofilia hasta observar el crecimiento de colonias (aproximadamente 18 h). Posteriormente, un volumen de 2 µL de solución enzimática (10 mg/mL) se colocó adyacente a las colonias de BAL. Las cajas moteadas y con proteasas se incubaron a 37 °C por 2 h, para

favorecer la difusión de la enzima y su acción hidrolítica. Subsecuentemente, se realizó el ensayo de antibiosis por bacteriocinas antes descrito. Una inhibición negativa (ausencia del halo) indica la sensibilidad de las sustancias inhibitorias a la enzima, y por lo tanto, la naturaleza peptídica de la sustancia antimicrobiana. Como control positivo de la producción de bacteriocinas se utilizó la cepa *L. acidophilus* NCFM® para la cual se siguió el procedimiento antes mencionado para las BAL del pulque.

#### **4.7.2. Evaluación de actividad peptidoglucano hidrolasas**

Para la evaluación de la actividad peptidoglucano hidrolasa de las cepas BAL de estudio se prepararon extractos enzimáticos semipurificados [72,78]. Las BAL con 24 h de crecimiento en caja se inocularon por asada en 50 mL de caldo MRS y se incubaron a 37 °C por 18 h en condiciones de microaerofilia. Posteriormente, se realizó la separación del pellet por medio de centrifugación a 10,000 x *g* por 30 min. Los pellets se recuperaron y se lavaron con buffer de Tris-HCl 100 mmol/L a pH 8, después de lo cual la suspensión se centrifugó a 10,000 x *g* por 30 min.

A continuación, se recuperó el pellet y se resuspendió en un buffer de extracción (Tris-HCl 10 mmol/L pH 8, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 10 mmol/L, NaCl 10 mmol/L y 2% (p/v) dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés)). Seguido de esto, la suspensión se agitó en un vortex a 3000 rpm durante 3 min y se llevó subsecuentemente a un baño caliente a 100 °C por 5 min. Inmediatamente después, la mezcla se centrifugó a 25,000 x *g* por 30 min, y el sobrenadante fue recuperado. Después de esto, la solución enzimática se dializó con una membrana de peso molecular de corte de 14 kDa durante una noche para concentrar y limpiar el extracto enzimático. Finalmente el producto de la diálisis se resuspendió en el buffer de lavado (Tris-HCl 100 mmol/L a pH 8) a una DO<sub>600</sub> de 2.5. Adicionalmente, se determinó la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford, se realizó la curva estándar con la enzima lisozima; y finalmente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Para cada prueba se preparó 1 mL de una suspensión celular de *Micrococcus luteus* en una solución buffer de fosfato 0.4 M (pH 6.7) con una  $DO_{450}$  de 1. La suspensión se esterilizó a 121 °C por 20 min. A continuación, a la suspensión se le añadió 1 mL del extracto enzimático de las BAL y la mezcla se incubó subsecuentemente a 37 °C. Para la determinación de la actividad peptidoglucano hidrolasa se midió la  $DO_{450}$  durante 30 min de incubación a intervalos de tiempo de 10 min. Adicionalmente, se realizó la prueba de control positivo usando la enzima lisozima en lugar del extracto enzimático de BAL. Para esta determinación se utilizaron 0.1 mL de solución enzimática (1 mg/100 mL) por mL de suspensión de *Micrococcus luteus* y se siguió el procedimiento aplicado a los extractos. Una disminución significativa de la  $DO_{450}$  con respecto al blanco (*Micrococcus luteus* sin extracto enzimático) indica la presencia de peptidoglucano hidrolasa en los extractos, y por lo tanto la producción de estas enzimas por las BAL de estudio [79].

La concentración de proteína se determinó utilizando la ecuación obtenida en la curva estándar de lisozima para la cuantificación de proteína por el método de Bradford (Apéndice A.3). Como velocidad de hidrólisis se consideró la pendiente formada en cada una de las cinéticas de actividad peptidoglucano hidrolasa (Apéndice A.4). El porcentaje de actividad PGH se determinó con la siguiente fórmula:

$$\%APGH = 100 - \frac{DO_{30min} * 100}{DO_0}$$

donde:

APGH = Actividad peptidoglucano hidrolasa

$DO_{30min}$  = Densidad óptica a los 30 min de incubación.

$DO_0$  = Densidad óptica al tiempo cero.

#### **4.8. Análisis estadístico**

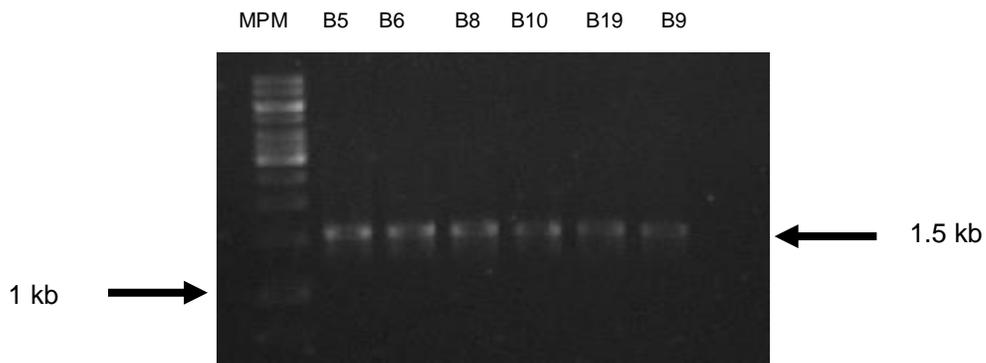
Se realizaron análisis ANOVA de un solo factor con un nivel de significancia del 95% para evaluar si existió o no diferencia significativa entre las distintas condiciones evaluadas. Adicionalmente, se llevó a cabo la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 95% ( $p < 0.05$ ) para los análisis de comparación de medias. Para los cálculos estadísticos se empleó el software Minitab 17 (Minitab Inc., EUA) para Windows 8.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1. Identificación genética de las bacterias ácido lácticas

Considerando que en este trabajo se pretende evaluar el potencial probiótico de un número de aislados bacterianos obtenidos a partir del pulque, resulta importante caracterizar genotípicamente dichos aislados, si es posible a nivel de género y especie. Se realizó la identificación molecular de seis BAL aisladas de pulque de Santa Catarina Otzolotepec, Tehuacán, Puebla mediante la amplificación por PCR y secuencia del gen ADNr 16S. Las cepas aisladas de pulque proveniente de Tamazulapan y Tehuacán habían sido previamente identificadas utilizando la misma técnica.

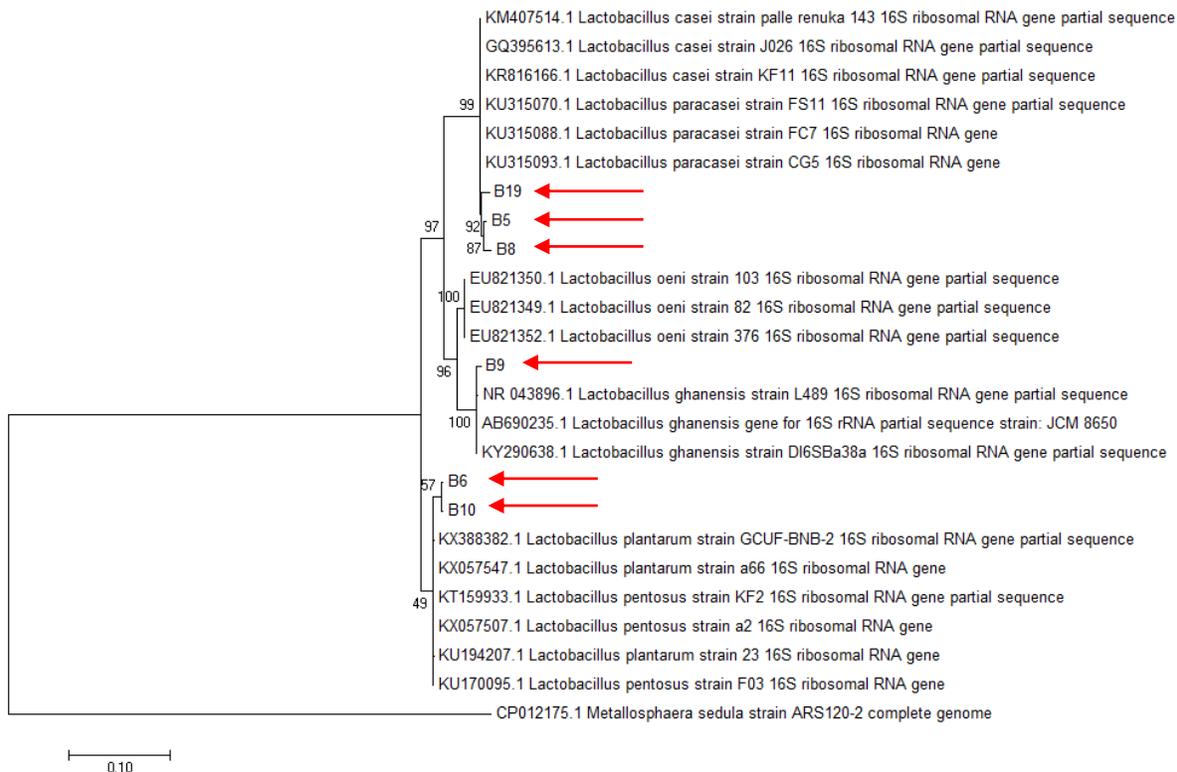
En la Figura 6 se muestra la imagen del gel de electroforesis en agarosa de los productos de PCR. Con ayuda del marcador molecular, se puede apreciar que los fragmentos de PCR tienen un peso molecular aproximado de 1.5 kb, que corresponden al tamaño de los genes 16S ADNr de las cepas a identificar.



**Figura 6.** Gel de agarosa al 1% (p/v) + 0.04% de EtBr de los productos de PCR. MPM = Marcador de peso molecular (GeneRuler™ de 1.5 kb DNA Ladder, Fermentas, USA); B5, B6, B8, B10, B19 y B9 = cepas a identificar.

Se construyó el árbol filogenético a partir de las secuencias (Apéndice A.1.) utilizando el método Neighbour-Joining con el programa MEGA 7.0.21 (Figura 7). Como

agrupación externa para la construcción del árbol se utilizó la secuencia del gen 16S ADNr de *Metallosphaera sedula* cepa ARS120-2.



**Figura 7.** Árbol filogenético de las secuencias identificadas y las secuencias de referencia obtenidas en el GenBank. Las cepas del proyecto están marcadas con una flecha. *Metallosphaera sedula* cepa ARS120-2 se utilizó como agrupación externa.

A partir de la caracterización, se determinó que todas las cepas pertenecen al género *Lactobacillus* y mostraron un 99% de homología con secuencias de microorganismos depositados en la base de datos del GenBank del NCBI, identificándose como: *L. paracasei*, *L. casei*, *L. ghanensis*, *L. plantarum* y *L. pentosus*.

El análisis del árbol filogenético permitió corroborar la identidad obtenida por el análisis con BLAST y la posición de las secuencias. Se observa que las cepas B5, B8 y B19 quedaron agrupadas dentro del nodo de *L. paracasei* y *L. casei*, sin embargo podría decirse que no son la misma cepa dada la posición en la que se encuentran. La cepa

B9 quedó agrupada dentro del nodo de *L. ghanensis*, con un 99% se puede asegurar que pertenece a dicho grupo. Por otra parte, las cepas B6 y B10 pertenecen al nodo formado por *L. plantarum* y *L. pentosus*, se podría sugerir que son la misma cepa; sin embargo, para realizar dicha aseveración se necesita un estudio más completo del genoma de ambas cepas, ya que hasta el momento sólo se ha estudiado un gen.

Los resultados obtenidos concuerdan con estudios previos en los cuales reportan que la microbiota del pulque pertenece en su mayoría a bacterias ácido lácticas, destacando las del género *Lactobacillus* [3]. Además, muchas BAL del género *Lactobacillus* han sido reconocidas por su potencial probiótico, destacando las especies *L. casei*, *L. paracasei* y *L. plantarum* [21].

En la Tabla 7 se muestran todas las BAL utilizadas en este trabajo con su correspondiente identidad y origen, considerando las cepas que fueron tipificadas en este trabajo y las que se caracterizaron previamente.

**Tabla 7.** Bacterias ácido lácticas de estudio, identidad y origen.

BAL	Identidad	Origen
B1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
B2	<i>Lactobacillus brevis</i>	
B3	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Tamazulapan del Progreso, Oaxaca.
B4	<i>Lactobacillus paracasei</i>	
B7	<i>Lactobacillus casei</i>	
B5		
B8	<i>Lactobacillus paracasei</i> o <i>casei</i>	Santa Catarina Otzolotepec, Tehuacán, Puebla
B19		
B6 B10	<i>Lactobacillus plantarum</i> o <i>pentosus</i>	
B9	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	San Jerónimo Zoyatitlanapan perteneciente al municipio de
B11	<i>Lactobacillus ghanensis</i>	Juan N. Méndez, Puebla
LA	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM®	Danisco (EUA)

## 5.2. Cinética de crecimiento microbiano

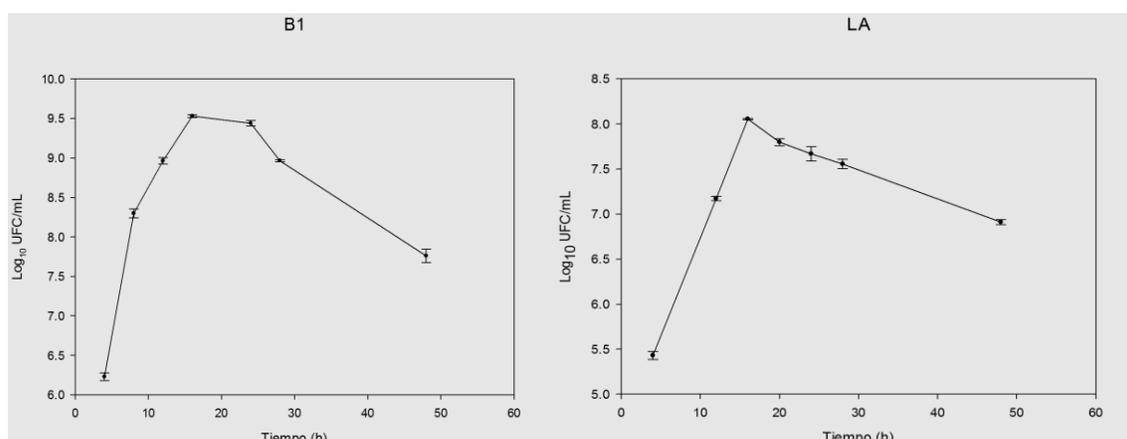
### 5.2.1. Crecimiento de las BAL

Las bacterias ácido lácticas como primer requisito para ser consideradas microorganismos probióticos deben estar en estado viable al tiempo de consumo. Aunque aún no se ha estipulado la dosis de microorganismos probióticos adecuada para el consumo humano, la industria de alimentos y la FDA sugieren cantidades de  $10^6$  UFC/mL. Sin embargo, se debe tomar en cuenta el efecto del almacenamiento y las condiciones a las que se somete al producto probiótico antes de llegar al lumen intestinal. Algunos investigadores han recomendado una ingesta diaria de  $10^9$  UFC/mL de microorganismo probiótico, para que el cultivo microbiano tenga una acción benéfica en el organismo [41,80,81].

Considerando lo anterior, para poder estudiar de manera objetiva el potencial probiótico de las cepas de estudio, es importante que la concentración de células sea la adecuada; idealmente mayor de  $10^9$  UFC/mL. Adicionalmente, para la evaluación de la producción de péptidos antimicrobianos por parte de las BAL, se ha reportado en la literatura que las bacteriocinas se producen generalmente en la fase exponencial, mientras que las enzimas peptidoglucano hidrolasas son secretadas en la fase exponencial y en la fase estacionaria [72,73]. Tomando en cuenta estas consideraciones, antes de realizar las pruebas de potencial probiótico y antibiosis, resulta importante la caracterización de las diferentes fases de crecimiento de cada cepa, para diseñar adecuadamente estos ensayos.

En el Apéndice A.2 se presentan las curvas de crecimiento microbiano de las 12 BAL de estudio durante 48 h de cultivo. Asimismo, también se presenta la curva de crecimiento de la cepa comercial *Lactobacillus acidophilus* NCFM® usada en este estudio como control positivo. En todas las cepas se observó un crecimiento exponencial entre las 16 y las 20 h de cultivo. En el crecimiento de la mayoría de las cepas se pudo apreciar una fase estacionaria bastante prolongada, que duró incluso para algunos casos hasta las 48 h de cultivo. Por otra parte, la mayoría de las cepas no presentaron una fase de muerte pronunciada en el intervalo de tiempo estudiado, con

excepción de las cepas B1 (*L. plantarum*) y B3 (*L. paracasei*). En la Figura 8 se presentan dos ejemplos de las cinéticas de crecimiento microbiano, perteneciente a una de las cepas de estudio y al control positivo.



**Figura 8.** Ejemplo de las cinéticas de crecimiento: B1 (*L. paracasei*) BAL de estudio y LA (*L. acidophilus*) el control positivo.

Todas las bacterias de estudio incluyendo la cepa control, alcanzaron el crecimiento requerido para las pruebas de potencial probiótico ( $10^8$  - $10^9$  UFC/mL) después de las 16 h de incubación. Con el fin de estandarizar los procedimientos empleados en las pruebas de potencial probiótico, se estableció que el periodo de crecimiento de las BAL de estudio fuera de 20 h, tiempo promedio en el que las cepas BAL de estudio alcanzaron un crecimiento de  $10^9$  UFC/mL.

Por otra parte, para las pruebas de producción de péptidos antimicrobianos se emplearon cultivos de BAL con 18 h de incubación, debido a que de manera general a este tiempo de cultivo las cepas BAL de estudio presentaron su fase exponencial de crecimiento completamente desarrollada. De acuerdo a la literatura, en esta fase de crecimiento se secretan los péptidos antimicrobianos [72,73].

En un estudio para determinar el potencial probiótico de la bacteria *Leuconostoc mesenteroides* P45, Escalante et al. [50] reportaron que esta cepa alcanzó un

crecimiento del orden de  $10^{10}$  UFC/mL. Considerando que el crecimiento celular obtenido para las cepas de estudio se encuentra en el intervalo recomendado en la literatura, dichas cepas cumplen con el primer requisito para continuar con el estudio de su potencial probiótico.

El-Shafei et al. [73] realizaron el aislamiento, selección y caracterización de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de diferentes alimentos tradicionales fermentados. De las cepas aisladas en este estudio, la cepa *Lactococcus lactis* presentó un amplio espectro inhibitorio y se reportó la producción de una bacteriocina del tipo nisina. Después de esto, los autores siguieron la producción de la bacteriocina en relación al crecimiento microbiano de la cepa productora durante 48 h. Los investigadores reportaron que la mayor producción de la bacteriocina se llevó a cabo durante la fase exponencial de crecimiento (20 h). Por otra parte, Garcia-Cano [72] realizaron la detección, localización celular y actividad antibacteriana de dos enzimas líticas producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, reportando que la mayor actividad lítica se presentó en la fase exponencial de crecimiento. Considerando los resultados obtenidos por estos investigadores, en el presente trabajo se optó por realizar las pruebas de producción de péptidos antimicrobianos durante la fase de crecimiento exponencial totalmente desarrollada.

### **5.2.2. Crecimiento de los microorganismos patógenos**

Los microorganismos patógenos utilizados en este estudio fueron *S. typhi*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. Estos microorganismos están asociados a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). En la Tabla 8, se muestran las concentraciones de las cepas patógenas alcanzadas a las 24 y 48 h de incubación en caldo de cultivo (BHI o nutritivo). De acuerdo al crecimiento mostrado, se fijó un tiempo de incubación para todas las cepas patógenas de 24 h, porque a ese tiempo dichas cepas alcanzaron un crecimiento del orden de  $10^8$  UFC/mL, que se encuentra dentro del intervalo de crecimiento necesario para realizar las pruebas antimicrobianas [50,63,76].

Se puede observar que a las 24 h las tres cepas patógenas alcanzan crecimientos del orden de  $10^8$  UFC/mL; sin embargo, a las 48 h hay un decremento en la población bacteriana por lo que se puede decir que se está alcanzando la fase de muerte.

**Tabla 8.** Crecimiento microbiano de los microorganismos patógenos.

<b>Patógenos</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>
<i>Escherichia coli</i>	$2.0 \pm 1.1 \times 10^8$	$6.30 \pm 0.92 \times 10^7$
<i>Salmonella Typhi</i>	$7.6 \pm 0.2 \times 10^8$	$1.26 \pm 0.51 \times 10^8$
<i>Listeria monocytogenes</i>	$8.4 \pm 0.4 \times 10^8$	$5.78 \pm 0.32 \times 10^7$

Se presenta la media  $\pm$  DE (n=2).

### 5.2.3. Crecimiento de microorganismos indicadores

Por otra parte, como microorganismos indicadores de la producción de bacteriocinas se utilizaron *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus sakei* ATCC 15521, por ser considerados como microorganismos sensibles a la presencia de dichos péptidos [63]. De acuerdo a la literatura, el crecimiento recomendado es de  $10^5$ - $10^6$  UFC/mL [63]. En la Tabla 9 se muestran los resultados de crecimiento a 12, 24 y 48 h. Con base en estos resultados, se decidió utilizar los microorganismos indicadores a las 12 h, tiempo en el cual ya se presentan crecimientos del orden de  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL.

**Tabla 9.** Crecimiento microbiano de los microorganismos indicadores para la prueba de bacteriocinas.

Indicadores	12 h	24 h	48 h
<i>Lactobacillus sakei</i>	5.2±0.6 X10 <sup>7</sup>	8.1±0.5 X10 <sup>8</sup>	1.2±0.1 X10 <sup>8</sup>
<i>Listeria monocytogenes</i>	1.4±0.1 X10 <sup>8</sup>	8.4±0.2 X10 <sup>8</sup>	5.8±0.3 X10 <sup>8</sup>

Se presenta la media ± DE (n=2).

### 5.3. Determinación de potencial probiótico *in vitro*

Los criterios bioquímicos que se deben considerar para seleccionar una cepa con potencial probiótico son su sobrevivencia a las condiciones del tracto gastrointestinal y su capacidad antimicrobiana hacia microorganismos patógenos. En su paso por el tracto gastrointestinal los microorganismos son expuestos principalmente a dos condiciones fisicoquímicas de estrés, pH ácido y presencia de sales biliares. La resistencia de los microorganismos a estas condiciones es esencial para considerar a una cepa como potencialmente probiótica. Adicionalmente, en el estómago las bacterias se enfrentan a otros microorganismos, con los cuales compiten para poder adherirse a la pared intestinal. Los mayores competidores de las BAL son microorganismos patógenos que comúnmente se encuentran en los alimentos y que causan las enfermedades infecciosas más importantes [41,50,76].

En este trabajo las BAL de estudio se sometieron a una condición de pH ácido (pH = 2) y a dos diferentes concentraciones de sales biliares (0.3% y 0.5%), de manera independiente. Adicionalmente, para evaluar la capacidad antimicrobiana de las cepas de estudio, éstas se confrontaron contra las cepas patógenas: *S. typhi*, *E. coli* (EPEC) y *Listeria monocytogenes*, causantes de algunas de las enfermedades más comunes y perniciosas transmitidas por alimentos.

### 5.3.1. Prueba de tolerancia a pH ácido y condiciones de sales biliares

Para probar el potencial probiótico es preciso evaluar a las cepas de estudio en un medio con pH ácido y concentraciones de sales biliares. Después de su consumo, la primera barrera con la que se encuentran los microorganismos probióticos es una condición de pH ácido en el estómago, que varía desde un pH de 1.5 durante el ayuno hasta 4 después de ingerir alimentos [82]. La segunda barrera que encuentran las bacterias probióticas en su paso a través del tracto gastrointestinal es la presencia de sales biliares en el intestino delgado, con concentraciones que pueden variar de 0.2% a 2% [50]. Idealmente se requiere que el mayor número posible de bacterias pueda llegar a la parte baja del intestino, para colonizarlo y así ejercer su función probiótica [83].

#### 5.3.1.1. Resistencia a pH ácido

En este estudio se evaluó *in vitro* la tolerancia de las BAL de estudio a un medio con pH ácido. Las cepas se sometieron a un pH de 2 durante 3 h, que es el tiempo promedio que tarda la digestión del alimento [50]. Las cepas de estudio mostraron porcentajes de sobrevivencia que van del 60 al 80% (Tabla 10). Con excepción de las cepas B5 y B6, las cepas de estudio fueron significativamente más resistentes a la condición de acidez con respecto a la cepa control *L. acidophilus* NCFM®. La cepa B9 (*L. paracasei* o *casei*) presentó una sobrevivencia significativamente mayor que el resto de las cepas

Escalante et al. [50] reportaron que la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada de pulque proveniente de Huitzilac (Morelos), tuvo un porcentaje de sobrevivencia del 75% después de ser expuesta a un pH de 2.5 durante 24 h. En el mismo estudio, los autores reportaron que la cepa *L. casei* Shirota, usada como cepa de referencia tuvo una sobrevivencia del 48% al someterla a las mismas condiciones.

Por otra parte, Castro-Rodríguez et al. [51] determinaron las propiedades probióticas de 4 cepas de *L. mesenteroides* aisladas de aguamiel de *Agave salmiana* de Nopaltepec (Estado de México). Los autores reportaron que en la evaluación de resistencia a una

condición de pH ácido (pH de 2 durante 3 h a 37 °C), las cepas de *L. mesenteroides* tuvieron porcentajes de sobrevivencia en el intervalo de 40 a 50%.

**Tabla 10.** Porcentaje de resistencia *in vitro* de las bacterias ácido lácticas del pulque a las barreras del tracto gastrointestinal.

BAL	% DE SOBREVIVENCIA		
	pH 2	0.3% SB	0.5% SB
<b>B1</b>	83.51 ± 0.51 <sup>c</sup>	80.20 ± 0.05 <sup>e</sup>	75.75 ± 0.07 <sup>e</sup>
<b>B2</b>	82.47 ± 0.34 <sup>d</sup>	96.71 ± 0.56 <sup>a</sup>	91.96 ± 0.70 <sup>a</sup>
<b>B3</b>	ND	ND	ND
<b>B4</b>	83.15 ± 0.01 <sup>d</sup>	89.72 ± 0.50 <sup>c</sup>	85.90 ± 0.56 <sup>c</sup>
<b>B5</b>	62.53 ± 0.19 <sup>f</sup>	90.07 ± 0.29 <sup>c</sup>	85.57 ± 0.38 <sup>c</sup>
<b>B6</b>	61.03 ± 0.26 <sup>g</sup>	77.52 ± 0.36 <sup>f</sup>	76.65 ± 0.09 <sup>e</sup>
<b>B7</b>	84.19 ± 0.36 <sup>c</sup>	87.90 ± 0.25 <sup>d</sup>	84.89 ± 0.18 <sup>c</sup>
<b>B8</b>	84.92 ± 0.41 <sup>b</sup>	80.75 ± 0.32 <sup>e</sup>	78.11 ± 0.05 <sup>d</sup>
<b>B9</b>	87.51 ± 0.17 <sup>a</sup>	89.12 ± 0.42 <sup>d</sup>	88.51 ± 0.05 <sup>b</sup>
<b>B10</b>	85.78 ± 0.37 <sup>b</sup>	76.83 ± 0.27 <sup>f</sup>	66.76 ± 0.12 <sup>f</sup>
<b>B11</b>	83.17 ± 0.03 <sup>d</sup>	89.26 ± 0.20 <sup>c</sup>	77.70 ± 0.01 <sup>d</sup>
<b>B19</b>	84.54 ± 0.37 <sup>c</sup>	80.96 ± 0.25 <sup>e</sup>	66.99 ± 0.10 <sup>f</sup>
<b>LA</b>	80.98 ± 0.19 <sup>e</sup>	95.21 ± 0.20 <sup>b</sup>	89.16 ± 0.13 <sup>b</sup>

\* Se presenta en la tabla la media ± DE (n = 2). Las letras corresponden a los resultados de la prueba Tukey (p < 0.05), letras diferentes en cada columna indican diferencia significativa en la actividad de las BAL (prueba Tukey por columna). ND = No determinado.

En otro estudio similar, González-Vázquez et al. [84] realizaron el aislamiento, identificación y caracterización parcial de la cepa *L. casei* J57 de pulque. En dicho estudio los autores sometieron a la cepa *L. casei* a un pH de 1.5 durante 4 h, reportando una sobrevivencia de aproximadamente 60%.

En general los reportes de la literatura coinciden con los resultados obtenidos en este trabajo. Más aún, la mayoría de las cepas estudiadas en este trabajo presentaron una mayor sobrevivencia que las cepas reportadas en la literatura. La resistencia de las

cepas a condiciones de pH ácido se ha atribuido a los mecanismos de regulación del pH intracelular y alcalinización del ambiente externo mediante reacciones de descarboxilación y desaminación [41,83].

### **5.3.1.2. Resistencia a sales biliares**

A continuación, se realizó la evaluación *in vitro* de las BAL y de *Lactobacillus acidophilus* NCFM® (control positivo) a dos concentraciones de sales biliares, 0.3% y 0.5% incubando a 37 °C durante 24 h. Las cepas de estudio presentaron porcentajes de sobrevivencia de 77 a 97% a una concentración de 0.3% de sales biliares y de 67 a 92% a una concentración de 0.5% de sales biliares (Tabla 10). La cepa B2 (*L. brevis*) presentó una sobrevivencia significativamente mayor que la cepa control *L. acidophilus*, para ambas concentraciones.

En el estudio realizado por Escalante *et al.* [50], la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 se sometió a dos concentraciones de sales biliares, 0.3% y 1% (24 h a 37 °C), mostrando resistencia del 100% en ambas concentraciones. Por otra parte, en el estudio realizado por Castro-Rodríguez *et al.* [51], se sometieron a 4 cepas de *L. mesenteroides* aisladas de aguamiel de *Agave salmiana* a una concentración de sales biliares de 0.5%. Los autores reportaron porcentajes de sobrevivencia del 88 al 90%. En otro estudio, González-Vázquez *et al.* [84], sometieron a la cepa *L. casei* J57 aislada de pulque a una concentración de sales biliares de 0.5% durante 4 h, presentando sobrevivencias de aproximadamente 60%.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo concuerdan con los reportes antes mencionados. Consecuentemente son buenas candidatas para ser potencialmente probióticas. La capacidad de resistencia a la condición de sales biliares se atribuye principalmente a la presencia de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH, por sus siglas en inglés), que se ha reportado ser secretada por algunas bacterias ácido lácticas, principalmente del género *Lactobacillus* [85,86].

### 5.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra bacterias patógenas

Una de las características más importantes de los microorganismos probióticos es su capacidad de eliminar competidores, que se atribuye principalmente a que estos microorganismos pueden adherirse eficazmente a la mucosa intestinal. Otro mecanismo que le confiere actividad antimicrobiana a los microorganismos probióticos es la producción de diversos metabolitos con actividad bactericida o bacteriostática [32,50,76].

Se realizó el ensayo de actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar, utilizando 20 µL de la bacteria ácido láctica. En la Figura 9 se muestran fotografías ejemplificativas del ensayo de difusión en agar de dos de las cepas de estudio, en cada una de las cajas petri fue inoculado el microorganismo patógeno y sobre el microorganismo patógeno se observan tres discos de papel filtro, de los cuales dos se inocularon con las cepas BAL de estudio y el disco restante se inoculó con agua destilada estéril (blanco). En la figura se puede apreciar que los discos que se encuentran en la parte inferior de la caja petri tienen alrededor una zona blanca (halo de inhibición) y como era de esperarse el disco que se ubica en la parte superior (blanco) no tiene esa zona.

Los ensayos mostraron diversos grados de actividad antimicrobiana de las BAL de estudio a los distintos patógenos, con halos de inhibición promedio que van desde 2.8 a 4 mm (Tabla 11).

La cepa B3 (*L. paracasei*) fue la única que no mostró actividad antimicrobiana contra los patógenos de estudio. Por otro lado, todas las cepas BAL de estudio (con excepción de B3) incluyendo el control (*Lactobacillus acidophilus* NCFM®), no presentaron diferencias significativas en la actividad antimicrobiana contra *S. typhi* y *E. coli*. La actividad contra *L. monocytogenes* fue significativamente menor para la cepa B4 (*L. paracasei*), con respecto al resto de las cepas.

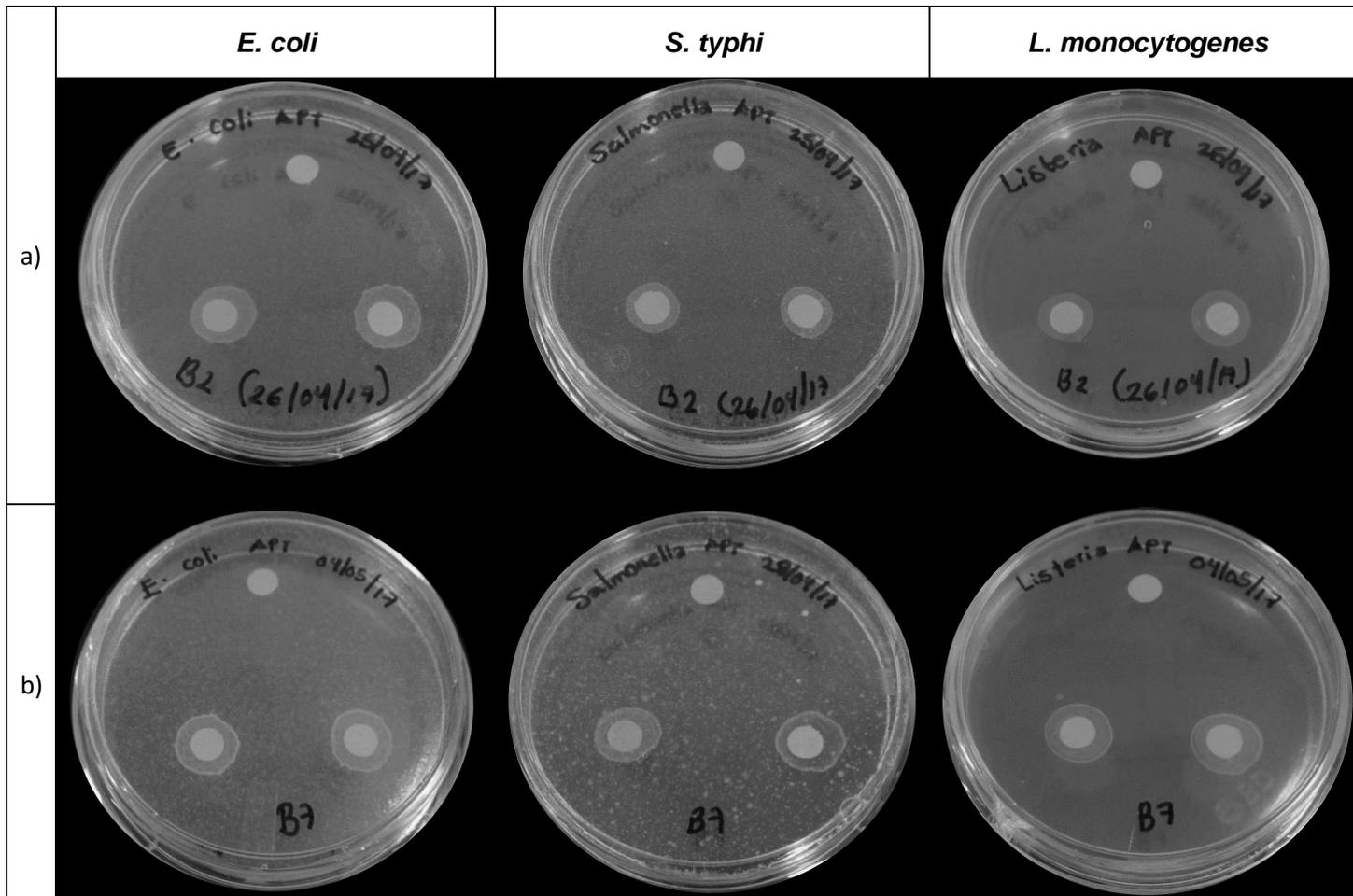
**Tabla 11.** Actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas de estudio contra patógenos modelo (halo de inhibición, en mm).

BAL	<i>E. coli</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>L. monocytogenes</i>
B1	3.50±0.46 <sup>a</sup>	3.50±0.38 <sup>a</sup>	3.31±0.53 <sup>a</sup>
B2	3.63±0.44 <sup>a</sup>	3.56±0.62 <sup>a</sup>	3.69±0.53 <sup>a</sup>
B3	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>c</sup>
B4	3.69±0.37 <sup>a</sup>	3.63±0.52 <sup>a</sup>	2.88±0.35 <sup>b</sup>
B5	2.94±0.32 <sup>a</sup>	3.56±0.32 <sup>a</sup>	3.44±0.42 <sup>a</sup>
B6	3.56±0.42 <sup>a</sup>	3.94±0.32 <sup>a</sup>	3.50±0.38 <sup>a</sup>
B7	3.63±0.35 <sup>a</sup>	3.75±0.27 <sup>a</sup>	3.56±0.42 <sup>a</sup>
B8	3.25±0.27 <sup>a</sup>	3.88±0.69 <sup>a</sup>	3.25±0.38 <sup>a</sup>
B9	3.19±0.26 <sup>a</sup>	3.81±0.37 <sup>a</sup>	3.50±0.48 <sup>a</sup>
B10	3.31±0.46 <sup>a</sup>	3.63±0.52 <sup>a</sup>	3.69±0.37 <sup>a</sup>
B11	3.25±0.70 <sup>a</sup>	3.38±0.35 <sup>a</sup>	3.75±0.53 <sup>a</sup>
B19	3.44±0.50 <sup>a</sup>	3.69±0.37 <sup>a</sup>	3.50±0.46 <sup>a</sup>
<b><i>L. acidophilus</i> NCFM<sup>®</sup> (control)</b>	3.06±0.32 <sup>a</sup>	4.00±0.66 <sup>a</sup>	3.63±0.35 <sup>a</sup>

\* Se presenta en la tabla la media ± DE (n = 4). Las letras corresponden a los resultados de la prueba Tukey (p < 0.05), letras diferentes en cada columna indican diferencia en la actividad de las BAL contra cada patógeno.

A partir de estos resultados, se concluye que todas las cepas con excepción de B3, mostraron actividad antimicrobiana contra todos los patógenos. En general, la actividad mostrada por las cepas de estudio fue comparable a la mostrada por la cepa control, *L. acidophilus* NCFM<sup>®</sup>, con excepción de la cepa B4 (*L. paracasei*) que presentó una actividad menor contra *L. monocytogenes*.

Ferrari et al. [76] realizaron la prueba antimicrobiana por el ensayo de difusión en agar con discos. Los autores reportaron halos de inhibición que van de 0.7 a 5 mm para la inhibición de *S. typhi* y *L. monocytogenes*. Las cepas estudiadas en el presente trabajo mostraron halos de inhibición que se encuentran en el intervalo reportado por éstos autores.



**Figura 9.** Fotografías ejemplificativas del ensayo de actividad antimicrobiana por el método de difusión en agar para las cepas: a) B2 (*L. brevis*) y b) B7 (*L. casei*).

La actividad antimicrobiana de las bacterias ácido lácticas puede deberse a distintos mecanismos, destacando la síntesis de metabolitos durante el proceso fermentativo como son ácido láctico y acético, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno y péptidos antimicrobianos. Entre estos últimos, las bacteriocinas y las enzimas peptidoglucano hidrolasas han tomado gran relevancia en las investigaciones actuales por su posible aplicación en las industrias de alimentos, farmacéutica, cosmética, entre otras [21,54]

#### **5.4. Determinación de la producción de péptidos antimicrobianos**

Los péptidos antimicrobianos son componentes intrínsecos del sistema inmune y son producidos por un gran número de organismos como mecanismo de defensa contra microorganismos patógenos. Consecuentemente, la habilidad de estos compuestos naturales para inhibir o inactivar bacterias patógenas ha elevado el interés en estas sustancias para usarlas en aplicaciones terapéuticas y farmacológicas [5,6]. Considerando la importancia de estos compuestos y dado que 11 de las bacterias ácido lácticas de estudio mostraron actividad antagonista importante contra los microorganismos patógenos modelo, en esta sección se reporta la evaluación *in vitro* del mecanismo de antibiosis por producción de péptidos antimicrobianos; específicamente, bacteriocinas y peptidoglucano hidrolasas.

##### **5.4.1. Evaluación de antibiosis por bacteriocinas**

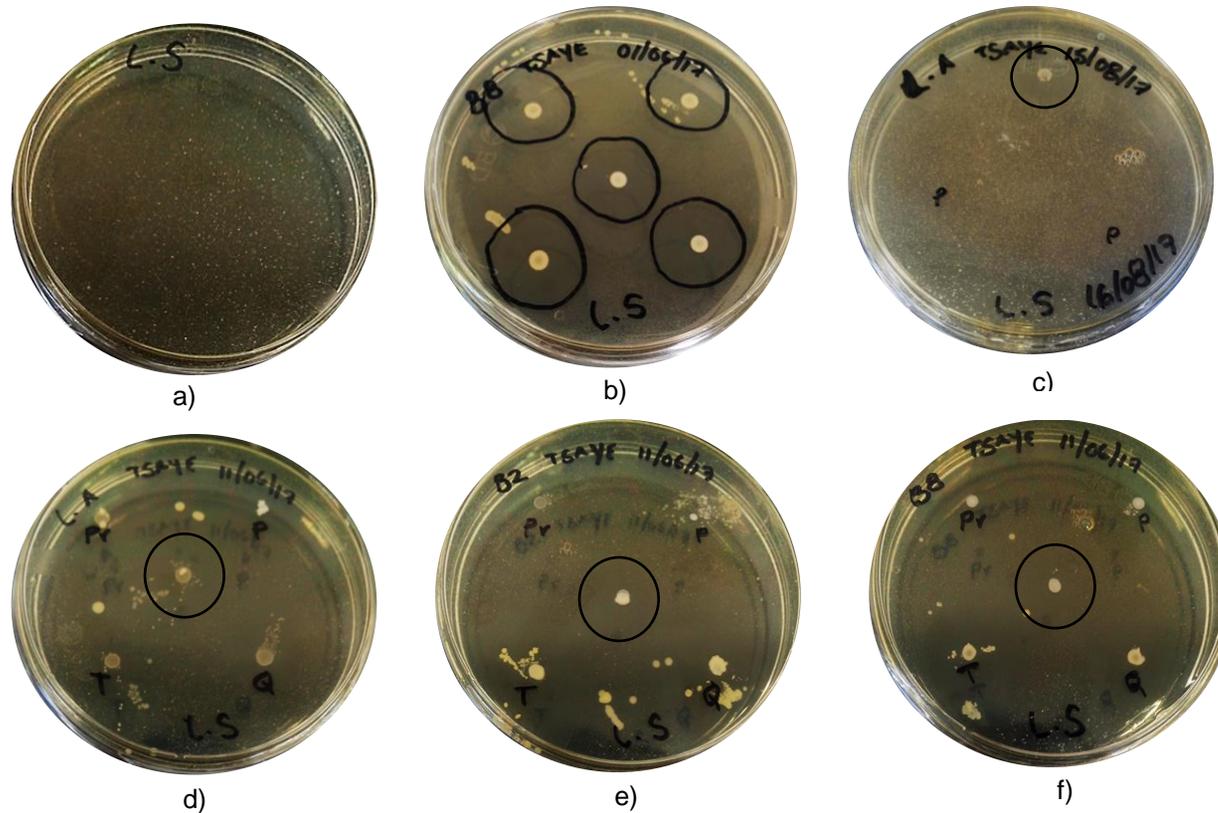
Las bacteriocinas producidas por BAL son de interés ya que tienen el estatus de sustancias generalmente reconocidas como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) y la denominación de presunción calificada de seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) [87]. Las técnicas utilizadas para la detección de bacteriocinas son diversas, pero la mayoría se basa en la difusión de la bacteriocina en un medio sólido para inhibir el crecimiento de un microorganismo sensible. Los métodos de detección se clasifican en directos e indirectos. El método directo es el ensayo de “Difusión en pozos” en el cual se utilizan sobrenadantes libres de célula de la bacteria productora. Por otra parte, el

método indirecto incluye las técnicas “Flip-streak” y “Mancha en el césped”, en las que se utiliza las células bacterianas de prueba en forma viable. De acuerdo a los reportes en la literatura, el método de “Mancha en el césped” es el más rápido y fácil de implementar. Adicionalmente se ha reportado que este método proporciona la mayor reproducibilidad en los resultados de detección de bacteriocinas [63,64].

Considerando lo anterior, en este trabajo se realizó la evaluación de antibiosis por bacteriocinas utilizando la técnica “Mancha en el césped” (Figura 10). Para esta, se emplearon dos cepas bacterianas reportadas como sensibles a bacteriocinas (*L. sakei* y *L. monocytogenes*). Los resultados de la prueba indicaron que ninguna de las BAL de estudio mostró actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, incluyendo la cepa control. Por otro lado, en contraste con los resultados contra *L. monocytogenes*, todas las cepas bacterianas incluyendo la cepa control mostraron actividad contra *L. sakei*.

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza peptídica, por lo que estas sustancias son sensibles a la acción hidrolítica de diversas proteasas. Por lo anterior, se evaluó la actividad antimicrobiana de las cepas de estudio contra *L. sakei* en presencia de 5 proteasas comerciales. En este trabajo, se corroboró la naturaleza proteica del compuesto antimicrobiano mediante la evaluación de la pérdida de actividad antimicrobiana de la cepa de estudio en presencia de proteasas.

Después de la exposición de las cepas de estudio a la actividad proteolítica, se pudo observar pérdida de actividad antimicrobiana en las cepas B2, B7, B8 y B9. Sin embargo, estas cepas no fueron sensibles a todas las proteasas evaluadas. La pérdida de actividad en las cepas B2 y B8 se pudo observar con la proteasa tipo XIV y la pepsina. Por otra parte, la pérdida de actividad en las cepas B7 y B9 se pudo observar sólo con pepsina y no fue una pérdida de actividad total. En cuanto a la cepa control (*L. acidophilus*) se observó pérdida de actividad con  $\alpha$ -quimotripsina y con la proteinasa K.



**Figura 10.** Fotografías ejemplificativas del ensayo de actividad antimicrobiana por el método de “Mancha en el césped” contra *L. sakei*. a) Crecimiento de *L. sakei*; b) Actividad de la cepa B8 (*L. paracasei* o *casei*); c) Actividad de la cepa control (*L. acidophilus* NCFM) en presencia de la enzima proteinasa K; d) Actividad de la cepa control (*L. acidophilus* NCFM) en presencia de enzimas proteasas (proteasa, pepsina, tripsina y quimotripsina); e) Actividad de la cepa B2 (*L. brevis*) en presencia de las enzimas proteasas y f) Actividad de la cepa B8 en presencia de las enzimas proteasas. Los círculos negros en las cajas c), d), e) y f) representan los blancos de cada prueba.

Lewus y Montville [63] realizaron la detección de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas mediante tres métodos utilizando 19 cepas sensibles. Los autores reportaron que el mejor método fue el de “Mancha en el césped” por ser la técnica más reproducible. Adicionalmente, estos autores concluyeron que la cepa más sensible a la presencia de estos compuestos fue *L. sakei*.

Por otra parte, Todorov & Dicks [88] realizaron la caracterización parcial de las bacteriocinas producidas por cuatro bacterias ácido lácticas aisladas a partir de la cerveza tradicional de cebada de Sudáfrica. Las bacterias fueron identificadas como *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. pentosus* y *Lactococcus lactis*. Asimismo, los autores reportaron que las bacteriocinas producidas por dichas bacterias tenían un peso molecular de 3.2 kDa, 10 kDa, 3.0 kDa y 2.9 kDa, respectivamente. Uno de los microorganismos sensibles utilizados en el estudio fue *L. sakei* el cual fue inhibido por todas las bacteriocinas estudiadas, de manera similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Las bacteriocinas parcialmente caracterizadas por Todorov y Dicks [88] encontradas en bacterias del género *Lactobacillus* se pueden clasificar en las clases I y II. A pesar de que se han reportado bacteriocinas producidas por *Lactobacillus* en las tres clases de bacteriocinas, las más abundantes pertenecen a la Clase II o no lantibióticos [87].

Sin embargo, a partir de los resultados que resultaron positivos en la prueba de “Mancha en el césped” no se puede concluir que los compuestos presentes son bacteriocinas. Esto se debe a que existen otros compuestos de naturaleza peptídica, a los cuales se les puede atribuir la actividad antimicrobiana (e.g. peptidoglucano hidrolasas).

#### **5.4.2. Evaluación de actividad peptidoglucano hidrolasa**

Las peptidoglucano hidrolasas (PGH) se han propuesto como una alternativa potencial para la sustitución de antibióticos debido a su actividad bacteriolítica de amplio espectro. Uno de los principales modos de acción de los agentes antibacterianos, es el

ataque de la pared bacteriana que también constituye un sustrato específico de las PGHs. Por lo anterior en este trabajo se realizó la semipurificación del extracto enzimático de las células bacterianas aisladas del pulque. Posteriormente se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford. Las concentraciones de proteína de los extractos de las cepas estuvieron en el intervalo de 37 a 490 µg/mL (Tabla 12), siendo la cepa B2 (*L. brevis*) la que presentó un contenido de proteína significativamente mayor que el resto de las cepas y los controles positivos.

A continuación se probaron los extractos enzimáticos semipurificados por su actividad lítica contra células no viables de *Micrococcus lysodeikticus*. Las cinéticas de actividad enzimática se presentan en el Apéndice A.4.

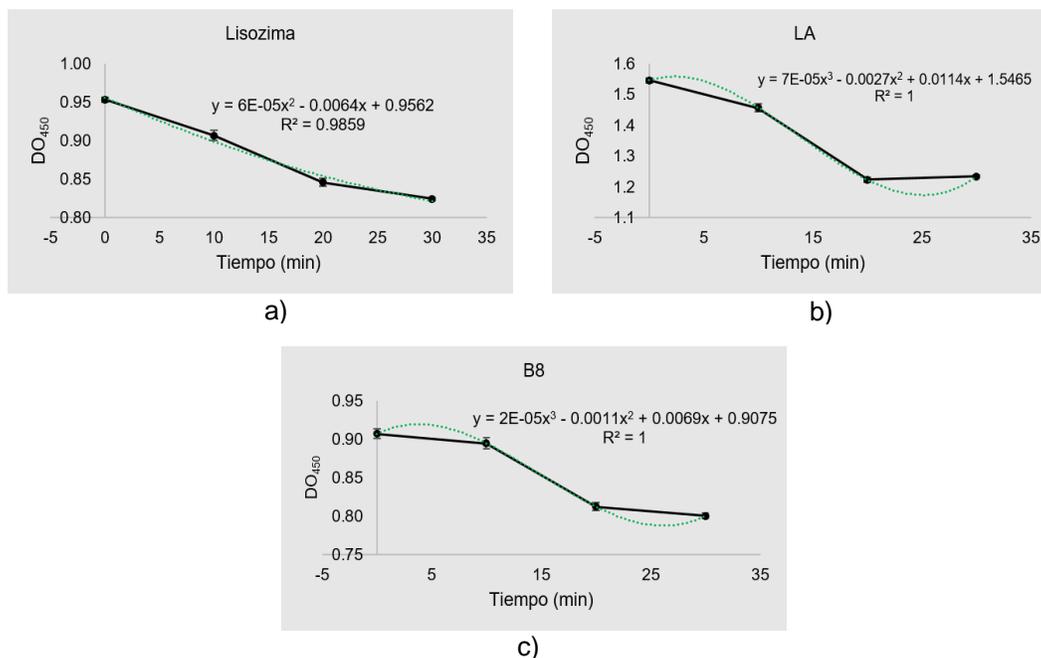
**Tabla 12.** Contenido de proteína, velocidad de reacción ( $d(DO_{450})/dt$ ) y porcentaje de actividad PGH de los extractos obtenidos de las bacterias ácido lácticas.

BAL	Proteína (µg/mL)	Velocidad de hidrólisis ( $-d(DO_{450})/dt$ )	Actividad PGH (%)
B1	307.38 ± 8.66 <sup>b</sup>	1.16 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00008 <sup>e</sup>	2.63 ± 0.11 <sup>g</sup>
B2	489.07 ± 3.06 <sup>a</sup>	3.69 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00032 <sup>c</sup>	8.12 ± 0.68 <sup>d</sup>
B4	140.71 ± 6.71 <sup>g</sup>	2.41 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00014 <sup>d</sup>	7.86 ± 0.45 <sup>e</sup>
B5	257.16 ± 8.68 <sup>c</sup>	2.80 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.000007 <sup>d</sup>	9.50 ± 0.03 <sup>d</sup>
B6	37.63 ± 0.67 <sup>i</sup>	2.55 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00006 <sup>d</sup>	7.61 ± 0.57 <sup>e</sup>
B7	243.07 ± 1.15 <sup>d</sup>	1.65 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00016 <sup>e</sup>	4.94 ± 0.34 <sup>f</sup>
B8	229.07 ± 3.06 <sup>d</sup>	4.04 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00011 <sup>b</sup>	11.79 ± 0.23 <sup>c</sup>
B9	173.07 ± 6.11 <sup>f</sup>	1.16 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00013 <sup>e</sup>	3.51 ± 0.38 <sup>f</sup>
B10	195.73 ± 16.65 <sup>e</sup>	0.33 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00001 <sup>f</sup>	0.81 ± 0.12 <sup>h</sup>
B11	203.07 ± 6.11 <sup>e</sup>	0.30 × 10 <sup>-3</sup> ± 0 <sup>f</sup>	0.88 ± 0.00 <sup>h</sup>
B19	255.73 ± 8.08 <sup>c</sup>	2.78 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00002 <sup>d</sup>	7.63 ± 0.17 <sup>e</sup>
LA	263.73 ± 10.07 <sup>c</sup>	11.72 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00040 <sup>a</sup>	20.21 ± 0.68 <sup>a</sup>
Lisozima	83.07 ± 3.06 <sup>h</sup>	4.48 × 10 <sup>-3</sup> ± 0.00030 <sup>b</sup>	13.53 ± 0.54 <sup>b</sup>

\* Se presenta en la tabla la media ± DE (n = 2). Las letras corresponden a los resultados de la prueba Tukey (p < 0.05), letras diferentes en cada columna indican diferencia en la actividad de los extractos proteicos de cada cepa BAL.

En la Tabla 12 se muestra el cambio de la  $DO_{450}$  con respecto al tiempo ( $-d(DO_{450})/dt$ ) y el porcentaje de actividad PGH obtenido para las 11 BAL de pulque que presentaron actividad antimicrobiana y los controles positivos (*L. acidophilus* y lisozima).

La velocidad de hidrólisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus* para los extractos enzimáticos de las cepas de estudio estuvo en el intervalo entre  $0.3 \times 10^{-3}$  y  $3 \times 10^{-3}$ , mientras que para los controles positivos *L. acidophilus* y lisozima fue de  $11 \times 10^{-3}$  y  $4.48 \times 10^{-3}$ , respectivamente. La cepa B8 (*L. paracasei* o *casei*) presentó la mayor velocidad de hidrólisis de todas las BAL estudiadas en el presente trabajo y significativamente igual a la presentada por el control positivo lisozima; sin embargo, presentó una menor velocidad que el control positivo *L. acidophilus*. En la Figura 11 se muestran tres ejemplos de las cinéticas de actividad enzimática obtenidas en este trabajo, las cinéticas pertenecen a los dos controles positivos utilizados y a la cepa de estudio que presentó la mayor velocidad de hidrólisis.



**Figura 11.** Actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus* durante un tiempo de cultivo de 30 min. a) Actividad de lisozima (1mg/100mL); b) Actividad del extracto enzimático de la cepa *L. acidophilus* NCFM®; c) Actividad del extracto enzimático de la cepa B8 (*L. paracasei* o *casei*).

Por otra parte, los porcentajes de actividad de las cepas de estudio estuvieron en el intervalo entre 0.8 y 12% (Tabla 12). La cepa B8 presentó un porcentaje de actividad de 11.79%, que fue significativamente mayor al resto de las cepas BAL de estudio. Sin embargo, la cepa control fue la que presentó el mayor porcentaje de actividad (20.21%) significativamente mayor que el control lisozima (13.53%), el cual es una enzima PGH pura. Se destaca también la actividad observada con las cepas B2 (*L. brevis*) y B5 (*L. paracasei* o *casei*), que aunque con menor actividad que la cepa B8, mostraron mayor actividad que las cepas de estudio restantes.

Considerando que las cepas B2 y B8 resultaron positivas tanto en la prueba de bacteriocinas como en la prueba de actividad PGH, es posible que la actividad antimicrobiana de dicha cepa se deba a la producción de enzimas PGH.

El trabajo desarrollado en esta tesis, constituye el primer reporte donde se realizan pruebas *in vitro* para la detección de PGH en bacterias ácido lácticas del pulque. Anteriormente, sólo se había realizado una búsqueda de genes que codifican para PGH en el genoma de la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada de pulque. Asimismo, los estudios de caracterización de PGH de BAL del género *Lactobacillus* son muy escasos. Regulski et al. [89] realizaron un estudio bioinformático para determinar las PGH hidrolasas que produce la cepa *L. casei* BL23, los autores reportaron la presencia de genes que codifican para 13 PGH. Asimismo, los investigadores detectaron con ayuda de técnicas proteómicas la expresión de 7 PGH durante el crecimiento exponencial de la cepa siendo la endopeptidasa Lc-p75 la más abundante. Por otra parte, la actividad obtenida con la cepa *L. acidophilus* NCFM puede explicarse a la presencia en su genoma de 11 genes que codifican para la producción de PGH, 9 de los cuales se predice pueden ser funcionales [90].

## 6. CONCLUSIONES

Se identificaron 6 de las cepas ácido lácticas de estudio, las cuales pertenecen al género *Lactobacillus* de las especies: *plantarum*, *pentosus*, *casei*, *paracasei* y *ghanensis*.

Después de realizar las pruebas de potencial probiótico *in vitro* a 12 cepas de bacterias ácido lácticas, 11 presentaron resistencia a la condición de pH ácido y a la presencia de sales biliares, así como capacidad para inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. A partir de las pruebas realizadas, se determinó que las cepas de estudio con mayor potencial probiótico son: *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. casei* y *L. ghanensis*. Las cepas B9 (*L. ghanensis*) y B2 (*L. brevis*) fueron las que mostraron los mejores resultados en las pruebas de acidez y sales biliares, respectivamente. Todas las cepas de estudio, excepto la cepa B3, mostraron actividad antimicrobiana contra los microorganismos patógenos, resultando en halos de inhibición estadísticamente similares a los obtenidos con la cepa probiótica control (*L. acidophilus*).

Por otra parte, en la evaluación de producción de bacteriocinas por la técnica “Mancha en el césped” las cepas B2 (*L. brevis*), B7 (*L. casei*), B8 (*L. paracasei*) y B9 (*L. ghanensis*) inhibieron a la bacteria sensible a bacteriocinas *L. sakei*. Adicionalmente, por medio de un ensayo proteolítico se confirmó la naturaleza proteica de las sustancias antimicrobianas. Con estos resultados se concluye que estas cepas son capaces de producir péptidos antimicrobianos, posiblemente bacteriocinas.

En la evaluación de actividad lítica contra la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus* destaca la actividad obtenida con los extractos proteicos de las cepas B8 (*L. paracasei*), B5 (*L. paracasei*) y B2 (*L. brevis*) que fue de 11.8, 9.5 y 8.1%, respectivamente, así como las cepas B4, B19, B6, B7 y B9, con una actividad ligeramente menor (7.86, 7.63, 7.61, 4.94 y 3.51%, respectivamente). La actividad PGH más destacada fue la de la cepa B8, la cual estuvo cercana a la obtenida con la enzima PGH lisozima (13.5%), usada como control positivo.

En conclusión, en este estudio se determinó el potencial probiótico *in vitro* de 12 cepas del género *Lactobacillus* aisladas a partir de pulque de tres localidades de los estados de Oaxaca y Puebla. De las cepas de estudio, 11 de ellas mostraron un potencial probiótico alto, comparable con el microorganismo probiótico control *L. acidophilus* NCFM®. Estas cepas se destacaron por su resistencia a pH ácido (pH = 2) y a sales biliares (0.3% y 0.5%), así como por su actividad antimicrobiana en contra de los microorganismos patógenos *E. coli*, *L. monocytogenes* y *Salmonella*. Asimismo, en este estudio se encontró que 8 de las cepas (B2, B4, B5, B6, B7, B8, B9 y B19) de estudio mostraron actividad peptidoglucano hidrolasa destacada. Por otra parte, se determinó que 4 de las cepas de estudio (B2, B7, B8 y B9) son posibles productoras de bacteriocinas.

En este trabajo se comprobó el potencial probiótico de al menos 11 bacterias ácido lácticas del pulque proveniente de Oaxaca y Puebla. El potencial de estas cepas autóctonas se puede aprovechar para la producción de productos probióticos en la industria de alimentos o nutracéutica. Por otra parte, en este estudio también se identificaron de manera novedosa en el pulque, al menos 8 cepas productoras de péptidos antimicrobianos. Estos péptidos pueden ser usados como conservadores de alimentos o como agentes antimicrobianos naturales en el área de alimentos o farmacéutica. Finalmente, los resultados obtenidos en este estudio pueden ayudar a revalorizar al pulque.

## 7. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se lograron realizar algunas de las principales pruebas *in vitro* para la determinación de potencial probiótico. Sin embargo, para asegurar dicho potencial hacen falta realizar más pruebas *in vitro* como son la adhesión al epitelio intestinal, la resistencia a lisozima y la simulación de la exposición a jugo gástrico. Por otra parte, para sugerir una actividad específica de las cepas con potencial probiótico es necesario realizar pruebas *in vivo*, en primer instancia en animales y por último, pruebas en humanos.

Asimismo, se sugiere ampliar la investigación en relación al mecanismo de antibiosis que utilizan las bacterias ácido lácticas aisladas del pulque para inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, retomando las cepas que presentaron resultados positivos en las pruebas de producción de péptidos antimicrobianos. Para este estudio se recomienda secuenciar el genoma completo de las cepas con mayor potencial, para determinar los genes que codifican para la síntesis de los péptidos antimicrobianos de cada bacteria. Asimismo, resulta importante realizar la purificación y caracterización de los péptidos antimicrobianos secretados por las cepas BAL. La caracterización de los péptidos deberá incluir en primer lugar la determinación del tamaño molecular mediante el uso de electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) posteriormente, la secuenciación de la estructura primaria de dichos péptidos. .

## 8. REFERENCIAS

- [1] A. Escalante, M. Giles-Gómez, G. Esquivel Flores, V. Acuña, R. Terrazas-Moreno, A. López-Munguía, P. Lappe-Oliveras, Pulque fermentation, in: *Handb. Plant-Based Fermented Food Beverage Technol.*, (2011): pp. 691–706.
- [2] P. Lappe-Oliveras, R. Moreno-Terrazas, J. Arrizón-Gaviño, T. Herrera-Suárez, A. García-Mendoza, A. Gschaedler-Mathis, Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages, *FEMS Yeast Res.* 8 (2008) 1037–1052. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00430.x.
- [3] A. Escalante, M.E. Rodríguez, A. Martínez, A. López-Munguía, F. Bolívar, G. Gosset, Characterization of bacterial diversity in pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis, *FEMS Microbiol. Lett.* 235 (2004) 273–279. doi:10.1016/j.femsle.2004.04.045.
- [4] L.F. Arenas-Cedillo, Caracterización de cepas de bacterias lácticas con actividad probiótica de pulque de la región mixteca, UNAM, Tesis de licenciatura, (2015).
- [5] Y.J. Gordon, E.G. Romanowski, A.M. McDermott, A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs, *Natl. Institutes Health.* 30 (2006) 505–515.
- [6] C. Cézard, V. Silva-Pires, C. Mullié, P. Sonnet, Antibacterial Peptides : A Review, (2011) 926–937.
- [7] Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Producción de maguey pulquero, (2013).
- [8] J.R. Backstrand, L.H. Allen, A.K. Black, M. de Mata, G.H. Pelto, Diet and iron status of nonpregnant women in rural, *Am. J. Clin. Nutr.* (2002) 156–164.
- [9] A. León-Rodríguez, P. Escalante-Minakata, M.I. Jiménez-García, L.G. Ordoñez-Acevedo, J.L. Flores Flores, A.P. Barba de la Rosa, Characterization of volatile compounds from ethnic agave alcoholic beverages by gas chromatography-mass spectrometry, *Food Technol. Biotechnol.* 46 (2008) 448–455.

- [10] A. Escalante, M. Giles-Gómez, G. Hernández, M.S. Córdova-Aguilar, A. López-Munguía, G. Gosset, F. Bolívar, Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach, *Int. J. Food Microbiol.* 124 (2008) 126–134. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.003.
- [11] R. Valadez-Blanco, G. Bravo-Villa, N.F. Santos-Sánchez, S.I. Velasco-Almendarez, T.J. Montville, The artisanal production of pulque, a traditional beverage of the Mexican highlands, *Probiotics Antimicrob. Proteins.* 4 (2012) 140–144. doi:10.1007/s12602-012-9096-9.
- [12] A. Wyszynska, P. Kobierecka, J. Bardowski, K. Krynicka-Jagusztyn, Elzbieta, Lactic acid bacteria — 20 years exploring their potential as live vectors for mucosal vaccination, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99 (2015) 2967–2977. doi:10.1007/s00253-015-6498-0.
- [13] O. Cano-Garrido, J. Seras-Franzoso, E. Garcia-Fruitós, Lactic acid bacteria : reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes, *Microb. Cell Fact.* (2015) 1–12. doi:10.1186/s12934-015-0313-6.
- [14] H. König, F. Jürgen, Lactic acid bacteria, in: *Biol. Microorg. Grapes, Must Wine, Germany*, 2009: pp. 3–5.
- [15] A.M. Rodas, S. Ferrer, I. Pardo, 16S-ARDRA , a tool for identification of lactic acid bacteria isolated from grape must and wine, *Syst. Appl. Microbiol.* 26 (2003) 412–422.
- [16] L.M.T. Dicks, P.A. Loubserl, O.P.H. Augustynl, Identification of *Leuconostoc oenos* from South African fortified wines by numerical analysis of total soluble cell protein patterns and DNA-DNA hybridizations, *J. Appl. Bacteriol.* 79 (1995) 43–48.
- [17] A. Lonvaud-funeil, A. Joyeux, O. Ledoux, Specific enumeration of lactic acid bacteria in fermenting grape must and wine by colony hybridization with non-isotopic DNA probes, *J. Appl. Microbiol.* 71 (1991) 501–508.

- [18] M. del R. Rodicio, M. del C. Mendoza, Identificación bacteriana mediante secuenciación del ARNr 16S: fundamento , metodología y aplicaciones en microbiología clínica, *Form. Médica Contin.* 22 (2017) 238–245.
- [19] E. Metchnikoff, Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction, in: *Prolong. Life Optimist. Stud.*, W. Heinemann, London, 1907: pp. 161–183.
- [20] H. Tissier, Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin., *CR.Soc Biol.* 60 (1906) 359–361.
- [21] V. Gupta, R. Garg, Probiotics, *Indian J. Med. Microbiol.* 27 (2009) 202–209. doi:10.4103/0255-0857.53201.
- [22] R. Fuller, Probiotics in man and animals, *J Appl Bacteriol.* 66 (1989) 365–378.
- [23] R. Havenaar, J. Huis in't Veld, Probiotics: A general view, in: *Wood BJB Lact. Acid Bact.*, New York, NY, 1992: pp. 209–224.
- [24] FAO/OMS, Probiotics in food, health and nutritional properties and guidelines for evaluation, *FAO.* 85 (2002).
- [25] M. Kumar, P.V. Behare, D. Mohania, S. Arora, A. Kaur, R. Nagpal, Health-promoting probiotic functional foods, *Focus Diet. Fibres.* 20 (2009).
- [26] U. Vyas, N. Ranganathan, Probiotics, prebiotics, and synbiotics : gut and beyond, *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012 (2012) 1–16.
- [27] S. Parvez, K.A. Malik, S.A. Kang, H. Kim, Probiotics and their fermented food products are beneficial for health, *J. Appl. Microbiol.* 100 (2006) 1171–1185. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x.
- [28] M. Kumar, D. Mohania, D. Poddar, P. Vishnu Behare, R. Nagpal, A. Kumar, et al., A probiotic fermented milk prepared by mixed culture reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in rats challenged with pathogens, *Int. J. Probiotics Prebiotics.* 4 (2016).
- [29] M. Kumar, V. Verma, R. Nagpal, A. Kumar, P. V Behare, B. Singh, P.K. Aggarwal,

- Anticarcinogenic effect of probiotic fermented milk and Chlorophyllin on aflatoxin-B1 induced liver carcinogenesis in rats, *Br. J. Nutr.* 107 (2012) 1006–1016. doi:10.1017/S0007114511003953.
- [30] L.M.T. Dicks, M. Botes, Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract : health benefits , safety and mode of action, *Benef. Microbes.* 1 (2010) 11–29. doi:10.3920/BM2009.0012.
- [31] M. Uccello, G. Malaguarnera, F. Basile, V. D’agata, M. Malaguarnera, G. Bertino, G. Bertino, M. Vacante, F. Drago, A. Biondi, Potential role of probiotics on colorectal cancer prevention, *BMC Surg.* 12 (2012) 1–8.
- [32] R. Nagpal, A. Kumar, M. Kumar, P. V. Behare, S. Jain, H. Yadav, Probiotics, their health benefits and application for developing healthier foods: a review, *FEMS Microbiol. Lett.* 334 (2012) 1–15.
- [33] W. Walker, Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defenses, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 30 (2000) S2–S7.
- [34] K. Mitsuyama, A. Toyonaga, M. Sata, Intestinal microflora as a therapeutic target in inflammatory bowel disease, *J. Gastroenterol.* 37 (2002).
- [35] H. Guetami, A. Bensoltane, D. Aichour, Z. Benabdallah, I.R. Khouatria, N.K. Khouatria, *In vitro* and *in vivo* Activity of *Lactococci* Strains against *Helicobacter pylori*, 12 (2012) 38–43.
- [36] G. Reid, Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection, *Am. J. Clin. Nutr.* 73 (2001).
- [37] C.N. Jacobsen, V. Rosenfeldt, A.E. Hayford, P.L. Møller, K.F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandstrom, M. Tvede, M. Jakobsen, Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans, *Am. Soc. Microbiol.* 65 (1999) 4949–4956.
- [38] K. Ramasamy, N. Abdullah, M.C. Wong, C. Karuthan, Y. Wan Ho, Bile salt

- deconjugation and cholesterol removal from media by *Lactobacillus* strains used as probiotics in chickens, *SCI.* 90 (2009) 65–69. doi:10.1002/jsfa.3780.
- [39] M.L. Van Tassell, M.J. Miller, *Lactobacillus* adhesion to mucus, *Nutrients.* 3 (2011) 613–636. doi:10.3390/nu3050613.
- [40] M.G. Vizoso Pinto, C.M.A.P. Franz, U. Schillinger, W. H. Holzapfel, *Lactobacillus* spp . with *in vitro* probiotic properties from human faeces and traditional fermented products, *Int. J. Food Microbiol.* 109 (2006) 205–214. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.029.
- [41] M.K. Tripathi, S.K. Giri, Probiotic functional foods : Survival of probiotics during processing and storage, *J. Funct. Foods.* 9 (2014) 225–241. doi:10.1016/j.jff.2014.04.030.
- [42] M.R. Torres-Vitela, Flora intestinal, probióticos y salud, 3ra., Guadalajara, Jalisco, 2006.
- [43] S. Álvarez, C. Herrero, E. Bru, G. Perdigon, Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice., *J. Food Prot.* (2001) 1768–1774.
- [44] K. Shida, R. Takahashi, T. E. Iwadate, S. Yasui H., T. Habu, *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model, *Clin. Exp. Allergy.* 32 (2002) 563–570.
- [45] R. Waard, E. Claassen, M.A.C.G. Bokken, B. Buiting, J. Garsen, J.G. Vos, Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in Rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* Shirota ingestion, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 10 (2003) 59–65.
- [46] S.E. Gilliland, M.L. Speck, C.G. Morgan, Detection of *Lactobacillus acidophilus* in Feces of Humans , Pigs , and Chickens<sup>1</sup>, 30 (1975) 541–545.

- [47] M.E. Sanders, T.R. Klaenhammer, Invited Review: The Scientific Basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM Functionality as a Probiotic, *J. Dairy Sci.* 84 (2001) 319–331. doi:10.3168/jds.S0022-0302(01)74481-5.
- [48] S.E. Gilliland, C.R. Nelson, C. Maxwell, Assimilation of Cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*, 49 (1985) 377–381.
- [49] M.E. Sanders, D.C. Walker, K.M. Walker, K. Aovama, T.R. Klaenhammer, Performance of Commercial Cultures in Fluid Milk Applications, (1996) 943–955. doi:10.3168/jds.S0022-0302(96)76445-7.
- [50] A. Escalante, M. Giles-Gómez, J.G. Sandoval-García, V. Matus, I. Campos-Quintana, F. Bolívar, *In vitro* and *in vivo* probiotic assessment of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a Mexican traditional alcoholic beverage, *Springerplus.* 5 (2016) 708. doi:10.1186/s40064-016-2370-7.
- [51] D. Castro-Rodríguez, H. Hernández-Sánchez, J. Yáñez-Fernández, Probiotic Properties of *Leuconostoc mesenteroides* Isolated from Aguamiel of *Agave salmiana*, *Probiotics Antimicrob.* 7 (2015) 107–117. doi:10.1007/s12602-015-9187-5.
- [52] M. Nishie, J.I. Nagao, K. Sonomoto, Antibacterial peptides “bacteriocins”: an overview of their diverse characteristic and applications, *Biocontrol Sci.* 17 (2012) 1–16.
- [53] D. Zielinska, A. Rzepkowska, A. Radawska, K. Zielinski, *In vitro* screening of selected probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from traditional fermented cabbage and cucumber, *Curr. Microbiol.* 70 (2015) 183–194. doi:10.1007/s00284-014-0699-0.
- [54] M. Olvera-García, C.E. Serrano-Maldonado, M. Quirasco, Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas, *BioTecnología.* 19 (2015) 25–43.
- [55] O.P. Neelay, C.A. Peterson, M.E. Snavely, T.C. Brown, A.F. Teclemariam, J.A.

- Campbell, A.M. Blake, S.C. Shneider, M.E. Cremeens, Antimicrobial peptides interact with peptidoglycan, *J. Mol. Struct.* 1146 (2017) 329–336. doi:10.1016/j.molstruc.2017.06.018.
- [56] A.B. Snyder, R.W. Worobo, Chemical and genetic characterization of bacteriocins : antimicrobial peptides for food safety, (2013). doi:10.1002/jsfa.6293.
- [57] J. Cleveland, T.J. Montville, I.F. Nes, M.L. Chikindas, Bacteriocins: safe , natural antimicrobials for food preservation, *Int. J. Food Microbiol.* 71 (2001) 1–20.
- [58] V. Bharti, A. Mehta, S. Singh, N. Jain, L. Ahirwal, S. Mehta, Bacteriocin: a novel approach for preservation of food, *Int. J. Pharm. Phamaceutical Sci.* 7 (2015).
- [59] R.H. Perez, T. Zendo, K. Sonomoto, Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications, *Microb. Cell Fact.* 13 (2014) S3.
- [60] M.P. Zacharof, R.W. Lovitt, Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a review article, *Procedia APCBEE.* 2 (2012) 50–56. doi:10.1016/j.apcbee.2012.06.010.
- [61] N.H. Salzman, C.L. Bevins, Dysbiosis—A consequence of Paneth cell dysfunction, *Semin. Immunol.* 25 (2013) 334–341. doi:10.1016/j.smim.2013.09.006.
- [62] G.A. Weiss, T. Hennes, Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis, *Cell. Mol. Life Sci.* 74 (2017) 2959–2977. doi:10.1007/s00018-017-2509-x.
- [63] C. Lewus, T. Montville, Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *J. Microbiol. Methods.* 13 (1991) 145–150.
- [64] V. Kaskoniene, M. Stankevicius, K. Bimbiraite-Surviliene, G. Naujokaityte, L. Serniene, K. Mulkyte, M. Malakauskas, A. Maruska, Current state of purification, isolation and analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, (2017) 1323–1335. doi:10.1007/s00253-017-8088-9.
- [65] Wulijideligen, A. Takayuki, H. Kazushi, H. Nakano, T. Miyamoto, Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare ' s milk , airag, *Anim. Sci. J.* (2012) 704–711. doi:10.1111/j.1740-

0929.2012.01010.x ORIGINAL.

- [66] P. Therdtatha, C. Tandumrongpong, K. Pilasombut, H. Matsusaki, S. Keawsompong, S. Nitisinprasert, Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling, Springerplus. 5 (2016) 1060. doi:10.1186/s40064-016-2693-4.
- [67] T.K. Lee, K.C. Huang, The role of hydrolases in bacterial cell-wall growth, Curr. Opin. Microbiol. 16 (2013) 760–766.
- [68] A.K. Sharma, S. Kumar, H. K., D.B. Dhakan, V.K. Sharma, Prediction of peptidoglycan hydrolases- a new class of antibacterial proteins, BMC Genomics. 17 (2016) 411.
- [69] E. Fridrich, E.C. Gaynor, Peptidoglycan hydrolases, bacterial shape, and pathogenesis, Curr. Opin. Microbiol. 16 (2013) 767–778.
- [70] S. Layec, B. Decaris, N. Leblond-Bourget, Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation, 159 (2008). doi:10.1016/j.resmic.2008.06.008.
- [71] W.G. Weisburg, S.M. Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane, 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study, 173 (1991) 697–703.
- [72] I. Garcia-Cano, L. Velasco-Pérez, R. Rodríguez-Sanoja, S. Sánchez, G. Mendoza-Hernández, A. Llorente-Bousquets, A. Farrés, Detection , cellular localization and antibacterial activity of two lytic enzymes of *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, (2011) 607–615. doi:10.1111/j.1365-2672.2011.05088.x.
- [73] H.A. El-Shafei, H.A. El-sabour, N. Ibrahim, Y.A. Mostafa, Isolation , screening and characterization of bacteriocin-producing, Microbiol. Res. 154 (2000) 321–331.
- [74] H. Niazi Amraii, H. Abtahi, P. Jafari, H. Reza Mohajerani, M. Reza Fakhroeslam, N. Akbari, *In vitro* study of potentially probiotic lactic acid bacteria strains isolated from traditional dairy products, J. Microbiol. 7 (2014) 4–8. doi:10.5812/jjm.10168.
- [75] I. Khan, S.C. Kang, Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus*

- plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi e A traditional Korean fermented food, Food Control. 60 (2016) 88–94. doi:10.1016/j.foodcont.2015.07.010.
- [76] I. da Silva Ferrari, J. Viana de Souza, C. Lacerda Ramos, M. Matiuzzi da Costa, R. Freitas Schwan, F. Silva Dias, Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese, Food Microbiol. 60 (2016) 29–38. doi:10.1016/j.fm.2016.06.014.
- [77] C. Lewus, A. Kaiser, T.J. Montville, Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, Appl. Environmental Microbiol. 57 (1991) 1683–1688.
- [78] D. Mora, F. Musacchio, M.G. Fortina, L. Senini, P.L. Manachini, Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains, (2003) 561–570.
- [79] J.A. Nash, T.N. Ballard, T.E. Weaver, H.T. Akinbi, The peptidoglycan-degrading property of lysozyme is not required for bactericidal activity *in vivo*, J. Immunol. 177 (2006) 519–526. doi:10.4049/jimmunol.177.1.519.
- [80] N. Saad, C. Delattre, M. Urdaci, J.M. Schmitter, P. Bressollier, An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, LWT - Food Sci. Technol. 50 (2013) 1–16. doi:10.1016/j.lwt.2012.05.014.
- [81] K.M. Tuohy, M. Pinart-Gilberga, M. Jones, L. Hoyles, A.L. McCartney, G.R. Gibson, Survivability of a probiotic *Lactobacillus casei* in the gastrointestinal tract of healthy human volunteers and its impact on the faecal microflora, 102 (2007) 1026–1032. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03154.x.
- [82] P. Das, S. Khowala, S. Biswas, In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples, LWT - Food Sci. Technol. 73 (2016) 383–390. doi:10.1016/j.lwt.2016.06.029.
- [83] R. Wu, W. Zhang, T. Sun, J. Wu, X. Yue, H. Meng, H. Zhang, Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid

- stress, *Int. J. Food Microbiol.* 147 (2011) 181–187. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.04.003.
- [84] R. González-Vázquez, A. Azaola-Espinosa, L. Mayorga-Reyes, L.A. Reyes-Nava, N.P. Shah, Y. Rivera-Espinoza, Isolation , identification and partial characterization of a *Lactobacillus casei* strain with bile salt hydrolase activity from pulque, *Probiotics Antimicrob.* 7 (2015) 242–248. doi:10.1007/s12602-015-9202-x.
- [85] M. Begley, C. Hill, C.G.M. Gahan, Bile Salt Hydrolase Activity in Probiotics, *Appl. Environmental Microbiol.* 72 (2006) 1729–1738. doi:10.1128/AEM.72.3.1729–1738.2006.
- [86] A.A. Argyri, G. Zoumpopoulou, K.-A. Karatzas, E. Tsakalidou, G.-J.E. Nychas, E.Z. Panagou, C.C. Tassou, Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests, 33 (2013) 282–291. doi:10.1016/j.fm.2012.10.005.
- [87] P. Alvarez-Sieiro, M. Montalbán-López, M. Dongdong, O. P. Kuipers, Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family, (2016) 2939–2951. doi:10.1007/s00253-016-7343-9.
- [88] S.D. Todorov, L.M.T. Dicks, Partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from regional South African barley beer, (2014).
- [89] K. Regulski, P. Courtin, M. Meyrand, I.J.J. Claes, S. Lebeer, J. Vanderleyden, J. Valderleyden, P. Hols, A. Guillot., Analysis of the Peptidoglycan Hydrolase Complement of *Lactobacillus casei* and Characterization of the Major c -D-Glutamyl-L-Lysyl-Endopeptidase, 7 (2012). doi:10.1371/journal.pone.0032301.
- [90] B.R. Johnson, T.R. Klaenhammer, Functional Autolysin in *Lactobacillus acidophilus* NCFM, 82 (2016) 5687–5697. doi:10.1128/AEM.02025-16.Editor.

## 9. APÉNDICES

### A.1. Secuencias en formato FASTA de las bacterias ácido lácticas del pulque

#### >B5

```
GGCCCAAACCTCCTAACGGAGGCAGCAGTAGGATTCTGCACATGACGCAGTCTGATGAGCACGCGCG  
TGAGTGAGATGCTTCGGGTCGTAAACTCTGTGTTGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTGTGCG  
CGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTG  
GCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAG  
CCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAA  
CTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGG  
TCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAT  
GCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAA  
GCATTCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAA  
GCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTAT  
CACCTGAGAGATCAGTTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGTTGTGTCGTCAGCTC  
GTGTGCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAG  
TTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCAT  
GCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCAGACCGCGAGGT  
CAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGA  
ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCC  
TCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTA  
AGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGAACAACGTGGCCTG
```

#### >B6

```
GGGGACACCGGCCCAAACCTCCCTACGGAGGCAGCAGTAAGGATCTCACATGACGAAGGTCTGAT  
GAGCACGCGCGTGAGGGAGGAGGTTCCGGCTCGTAAACTCTGTGTAAGAAGAACATATCTGAGAGT  
AACTGTCAGGTATGACGGTATTTAACCCAGAAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT  
ACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTTTTTAAGTCT  
GATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAG  
GACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGC  
GGCTGTCTGGTCTGTAACCTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCT  
GGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTA  
ACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGC  
CCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT  
ACTATGCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCG  
TCAGCTCGTGTGCGTGAGATGTTGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAG  
CATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA  
TCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTC  
GCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGA  
AGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA  
CCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCC  
GCCTAAGGTGGGACAGATGATAGGGTGTAGTCAAACGAGTAGTGCAGG
```

**>B8**

CCCCAAACTCCTACCGGAGGCAGCAGTAAGGATCTCACATGACGCAAGTTCGATGAGCACGCCGC  
GTGAGGGAGAGCTTCGGGTCGTAAACTCTGTGTGAGAGATGGTCGGCAGAGTAACTGTGCCGCGTG  
ACGGTATCCAACCAGAAAGCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAG  
CGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTC  
GGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGA ACTCCA  
TGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGT  
AACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATAACCCTGGTAGTCCATGCCGT  
AAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATCAAGCATT  
CGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTG  
GAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACCTGA  
GAGATCAGTTTTCCCTTCGGGGGCAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGT  
GAGATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTTAGTTGGGCA  
CTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTT  
ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCAAGCT  
AATCTCTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCT  
AGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACAC  
CATGAGAGTTTGTAAACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCCTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGG  
GACAAATGATTAGGGTGTAGTCGAACAACGTGGCCTCC

**>B9**

CGGCCCAAACCTTCCTACCGGGAGGCAGCAGTAGGAATCCTGCACATTGACGAAGGTGATGAGCA  
ACGCCGCGTGAGTGAGAGTTTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTCAGAGAAGAACGTGTGCGAGAGTA  
ACTGTTTCGTGCAGTGACGGTATCTGACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCGTTTTTTAAGTC  
TGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGAAGTCGTGCATTGGAAACTGGAGA ACTTGAGTGCAGAAGAG  
GAGAGTGGA ACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAAGC  
GGCTCTCTGGTCTGTA ACTGACGCTGAGGTTGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATAACCCT  
GGTAGTCCACGCTGTA AACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCT  
AACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGG  
CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGAC  
ATCTTCTGCAAGCCTGAGAGATCAGGTGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCATGGTTG  
TCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATTGCCAGTTGC  
CAGCATTAGTTGGGCACTCTGACAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTC  
AAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGATAACAAGAGTTGCTAG  
ACCGCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAGTCGTTCTCAGTTCGGATTGCAGGCTGCAACTCGCCTGCA  
TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC  
ACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCATTAGGAACCG  
CCGTCTAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTCGAACAACGTGCAGG

**>B10**

CGGCCCCCAAACCTTCCTACGGAGGCAGCAGTAGGATCTCACATGACGAAGTCGATGAGCACGCCGC  
TGAGTGAGAGGGTTTTCCGGCTCGTAAA ACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCA  
GGTATTGACGGTATTTAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  
GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCGTTTTTTAAGTCTGATGT

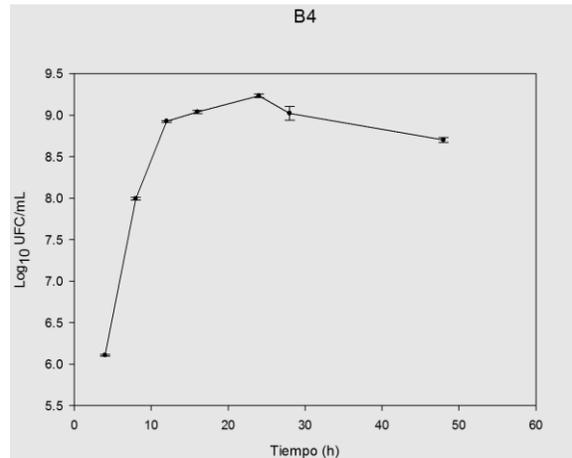
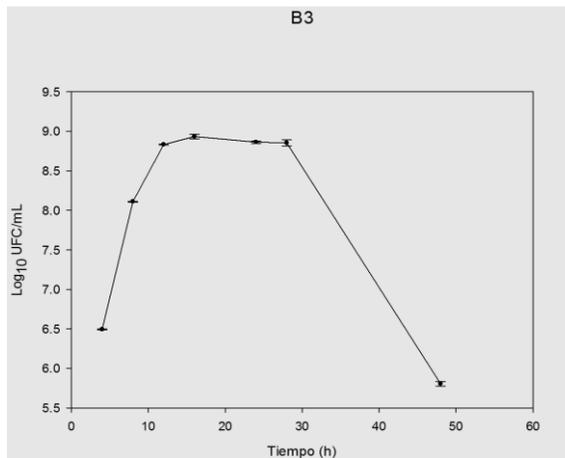
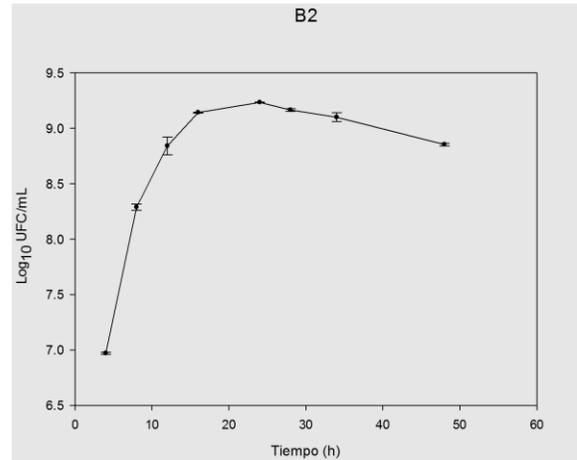
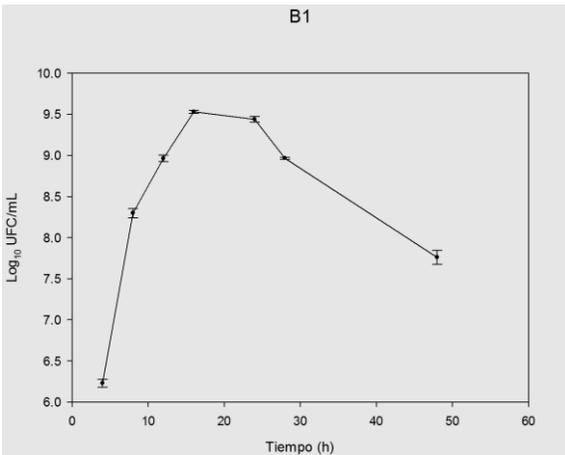
GAAAGCTTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAG  
TGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTG  
TCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT  
CCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCAT  
TAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA  
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATACTAT  
GCAAATCTAAGAGATTAGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGC  
TCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATTATCAGTTGCCAGCATT  
AGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATC  
ATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAACTCGCGA  
GAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTC  
GGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGC  
CCGTACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCAAAGTCGGTGGGGTAACCTTTTAGGAACCAGCCGCCTA  
AGGTGGGACAGATGATTAGGGTGAAGTCGATCAATGTGCCGG

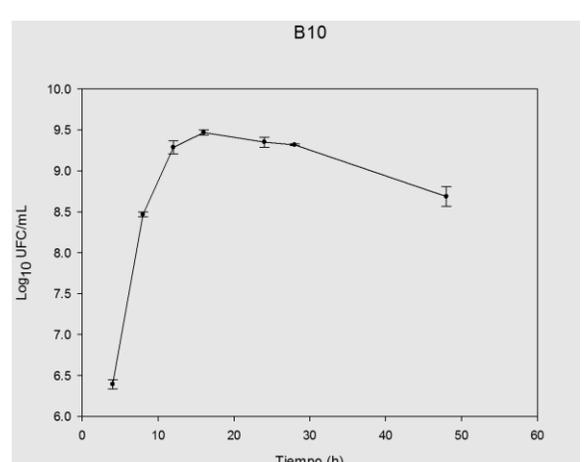
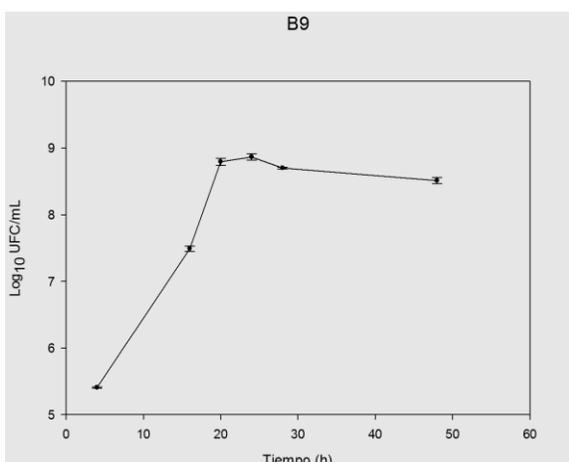
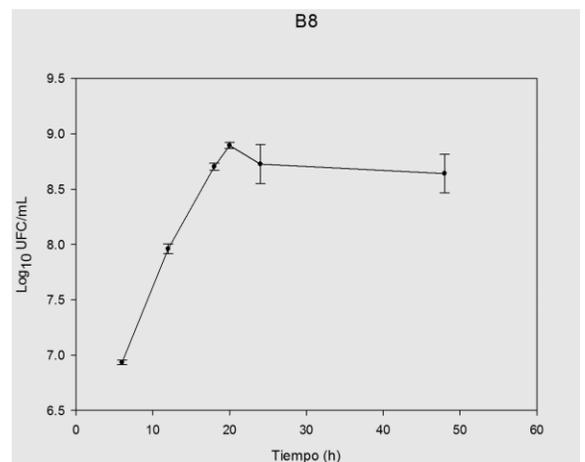
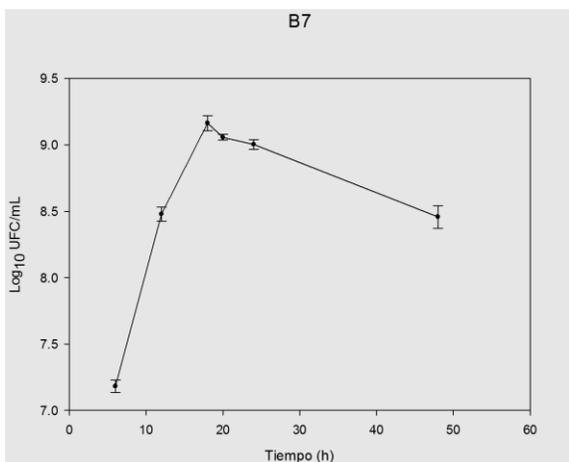
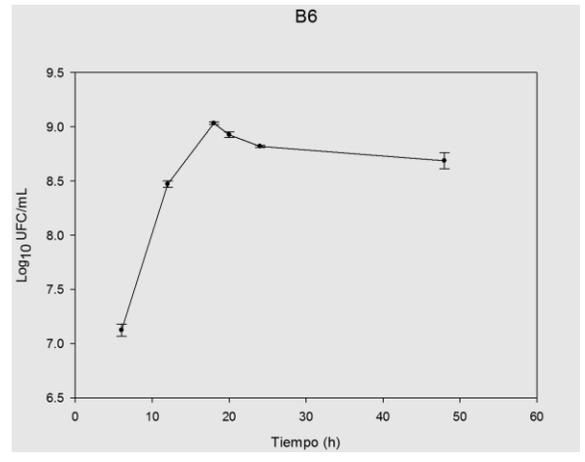
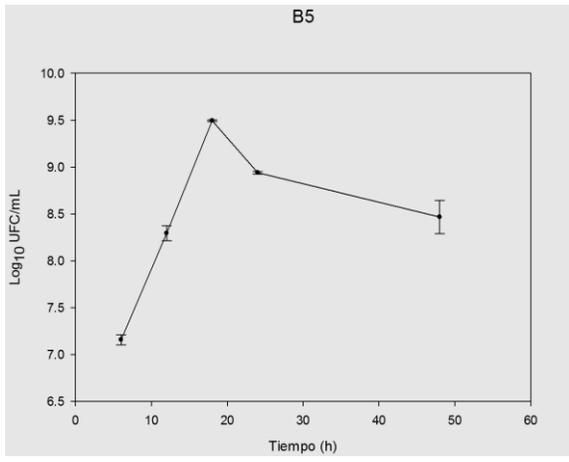
**>B19**

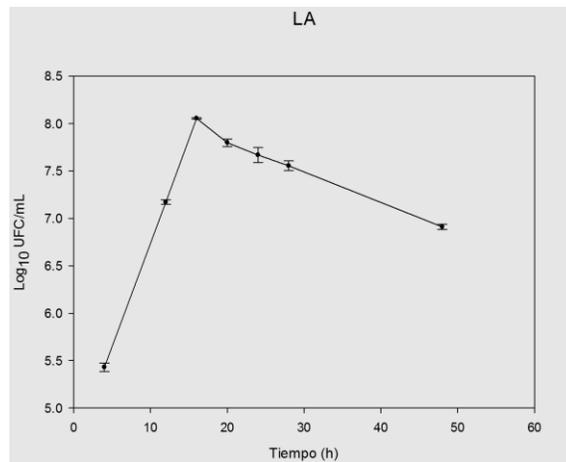
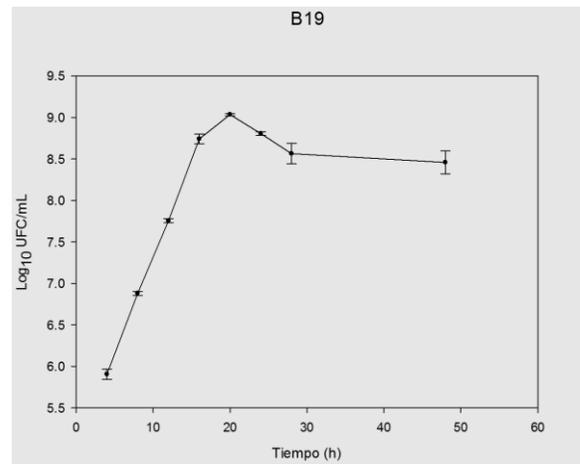
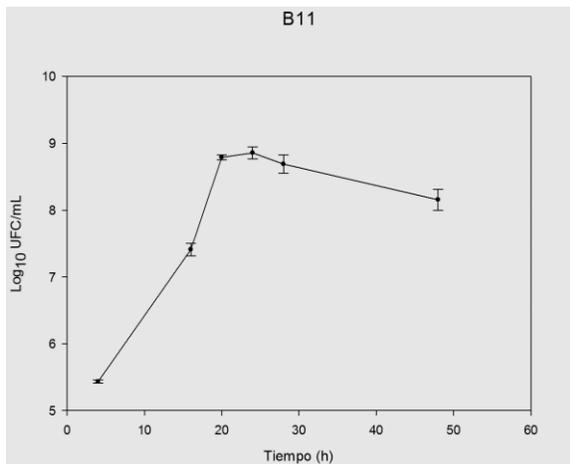
CAACTTCCTACGGAAGCAGGCAGTAGGATCTACACATGAACGCAGGTTCGATGGAGCACGCCGCGTG  
AGTGAGATGCTTCGGGTCGTAAACTCTGTGTGAGAAGAATGGTCGGCAGAGTAACTGTGTCGGCGT  
GACGGTATCCAACCCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC  
AAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  
CTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACT  
CCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC  
TGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGC  
CGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGCA  
TTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG  
GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCAC  
CTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTG  
TCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC GCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATTAGTTG  
GGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCC  
CCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTTGCGAGACCGCGAGGTCA  
AGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAAT  
CGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTC  
ACACCATGAGAGTTTGTAAACACCCGAAGCCGGTGGCGTAACCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAG  
GTGGGACAAATGATTAGGGTGAAGTCGAACAACGTGTCATGC

## A.2. Cinéticas de crecimiento microbiano de las bacterias ácido lácticas

Las cinéticas fueron realizadas por duplicado, en cada curva se presenta el promedio  $\pm$  DE.

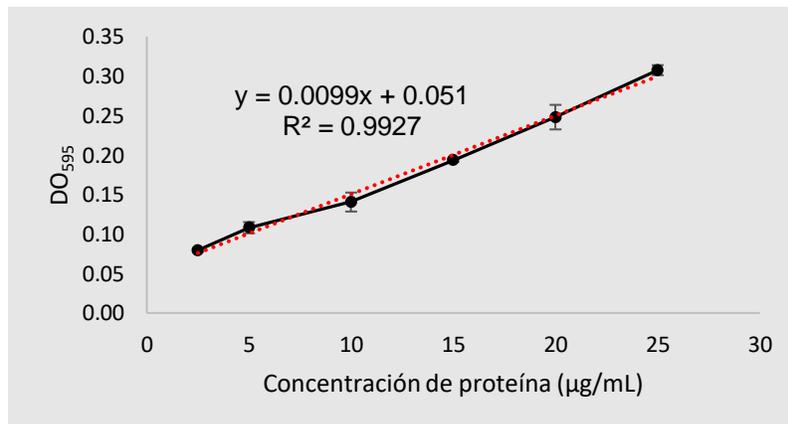






### A.3. Curva estándar de lisozima para la cuantificación de proteína por el ensayo de Bradford

La curva se realizó por duplicado, se representa el promedio  $\pm$  DE.



#### A.4. Cinéticas de actividad peptidoglucano hidrolasas

Las cinéticas fueron realizadas por duplicado, en cada curva se presenta el promedio  $\pm$  DE.

