



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS CON
ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE PULQUE DE LA REGIÓN MIXTECA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO DE ALIMENTOS**

PRESENTA

LEÓN FERNANDO ARENAS CEDILLO



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado

Presidente: M. en C. Lucía Cornejo Barrera

Vocal: Dr. José Adelfo Escalante Lozada

Secretario: M. en B. Martha Giles Gómez

1^{er} Suplente: M. en C. Beatriz Ruiz Villafán

2^{do} Suplente: Dra. Iliana Elvira González Hernández

Lugar donde se desarrolló el tema: Cepario del Departamento de Biología,
Facultad de Química, UNAM.

Asesora del tema

Sustentante

M. en B. Martha Giles Gómez

León Fernando Arenas Cedillo

Este trabajo contó con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN207914 y CONACYT Ciencia Básica 239567. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de licenciatura/elaboración de tesis dentro de este proyecto PAPIIT

Índice

I. Índice de figuras	6
II. Índice de tablas	7
Resumen	8
Marco teórico.....	9
1. Bacterias ácido lácticas.....	9
1.1. Características principales.....	9
1.2. Características metabólicas.....	10
1.3. Características genéticas	16
2. Probióticos	19
2.1. Definición.....	19
2.2. Capacidad de resistencia al ambiente gastrointestinal del hospedero	20
2.3. Capacidad antimicrobiana	22
2.4. Capacidad de adhesión.....	27
2.5. Efectos en la salud del hospedero.....	28
3. Pulque.....	29
3.1. Definición.....	29
3.2. Proceso de producción del pulque	30
3.3. Características fisicoquímicas del aguamiel y el pulque.....	33
3.4. Características nutrimentales del pulque y el aguamiel.....	35
3.5. Características microbiológicas del pulque y el aguamiel	36
3.6. Efectos benéficos a la salud asociados al consumo de pulque	40
3.7. Justificación	41
Hipótesis.....	43
Objetivo general	44
Objetivos particulares.....	44
Materiales y metodología	45
1. Reactivación y conservación de cepas	45
1.1. Conservación a mediano plazo	46

1.2. Conservación a largo plazo	46
1.3. Reactivación de cepas	46
2. Morfología colonial y microscópica, Gram y prueba de la catalasa	47
3. Evaluación cualitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares	47
4. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.	48
4.1. Recuperación y preparación de BAL's	48
4.2. Acondicionamiento de bacterias patógenas	48
4.3. Preparación de medio con el microorganismo patógeno.....	48
4.4. Ensayo de actividad antimicrobiana	49
5. Evaluación cuantitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares	49
6. Identificación molecular de BAL's mediante el análisis de la secuencia del gen	
rDNA 16S.....	50
6.1. Extracción de DNA cromosomal.....	50
6.2. Electroforesis en gel de agarosa	50
6.3. Amplificación del rDNA 16S por PCR.....	51
6.4. Secuenciación e identificación.....	52
7. Identificación de BAL's por el sistema bioquímico miniaturizado API 50 CH [®] de	
BioMérieux [™]	53
Resultados y discusión.....	55
1. Recuperación de la colección	55
2. Características morfocoloniales, microscópicas y prueba de la catalasa.....	55
3. Evaluación cualitativa de resistencia a acidez y presencia de sales biliares ...	57
4. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana contra microorganismos	
patógenos	62
5. Evaluación cuantitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares	
.....	71
6. Identificación molecular de BAL's mediante el análisis de la secuencia del gen	
rDNA 16S.....	73
7. Identificación de BAL's por el sistema bioquímico miniaturizado API 50 CH [®] de	
BioMérieux [™]	87

Conclusiones.....	88
Perspectivas.....	88
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de BAL's aisladas de distintos pulques de la región de la Mixteca Oaxaqueña	89
Anexo 2. Sistemas bioquímico miniaturizado API 50 CH® de BioMérieux™	105
Bibliografía	107

I. Índice de figuras

Figura 1. Principales rutas metabólicas para BAL's	11
Figura 2. Ingreso de pentosas y pentitoles al metabolismo heterofermentativo	12
Figura 3. Metabolismo de la galactosa y la lactosa	13
Figura 4. Rutas para la formación de copuestos derivados del piruvato	15
Figura 5. Esquema de trabajo	45
Figura 6. Morfologías y Gram observados	56
Figura 7. Niveles de desarrollo para BAL's en agar MRS, posteriores a la exposición a pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares	59
Figura 8. Halos de inhibición de las BAL's contra <i>S. Typhi</i>	64
Figura 9. Halos de inhibición de las BAL's contra <i>S. Enteritidis</i>	65
Figura 10. Halos de inhibición de las BAL's contra <i>L. monocytogenes</i>	65
Figura 11. Halos de inhibición de las BAL's contra <i>V. cholerae</i> serovar. No 01	66
Figura 12. Halos de inhibición de las BAL's contra EPEC.....	67
Figura 13. Fotografía del gel de electroforesis en agarosa 1 % P/V + 0.04 % EtBr para la extracción de DNA cromosomal	74
Figura 14. Fotografía del gel de electroforesis en agarosa 1 % P/V + 0.04 % EtBr para los productos de PCR	74
Figura 15. Fotografía del gel de electroforesis en agarosa 1 % P/V + 0.04 % EtBr para los productos de PCR purificados	75
Figura 16. Árbol filogenético.....	86

II. Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación de BAL's en función de su tipo de fermentación	14
Tabla 2. Resistencia a antibióticos, acidez y sales biliares en algunas BAL's	18
Tabla 3. Microorganismos reconocidos como probióticos.....	20
Tabla 4. Bacteriocinas producidas por BAL's	26
Tabla 5. Características de los distintos tipos de aguamiel, de acuerdo a la NMX-V-022-1972.....	33
Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del pulque, de acuerdo a la NMX-V-037-1972	34
Tabla 7. Análisis nutrimental de distintas clases de pulque, por cada 100 g.....	35
Tabla 8. Perfil de aminoácidos del pulque.....	36
Tabla 9. Poblaciones bacterianas presentes en aguamiel y en pulque.....	36
Tabla 10. Poblaciones de levaduras presentes en pulque	38
Tabla 11. Cepas resistentes seleccionadas	60
Tabla 12. Resultados de la determinación cualitativa del efecto antimicrobiano...	69
Tabla 13. Resultados de la evaluación cuantitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares	71
Tabla 14. Identidad de secuencias.....	76
Tabla 15. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas.....	77
Tabla 16. Especies de BAL's identificadas dentro de la colección	81
Tabla 17. Identidades obtenidas por el sistema bioquímico miniaturizado API 50 CH [®] de BioMérieux [™]	87

Resumen

El pulque es una bebida alcohólica obtenida de la fermentación espontánea de la savia (aguamiel) de distintas especies de maguey (*Agave americana*, *A. ferox*, *A. mapisaga*, *A. salmiana*, entre otras). Debido a su proceso artesanal de elaboración, se cuentan con distintas fuentes de microorganismos durante su producción y transporte, por lo que su ecología microbiana es compleja y dinámica. Mediante estudios basados en técnicas dependientes e independientes del cultivo (Escalante *et al.*, 2004; 2008), se ha dilucidado que las bacterias ácido lácticas constituyen uno de los principales grupos dentro del pulque, dominado por distintas especies de los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, y que en algunos casos su diversidad se conserva independientemente de su origen geográfico. Además de su importancia en la elaboración de productos alimentarios fermentados, se han identificado distintas cepas de bacterias lácticas que cuentan con la capacidad de brindar beneficios a la salud del consumidor (capacidad probiótica), por lo que Campos (2010), evaluó la microbiota de muestras de pulque provenientes del municipio de Huitzilac, Morelos, en busca de cepas potencialmente probióticas, logrando aislar e identificar mediante pruebas *in vitro* una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* denominada P45. Posteriormente Matus (2011), estudió su capacidad probiótica *in vivo*, en ratones Balb/c machos y hembras, proporcionando evidencias del efecto probiótico *in vivo* de esta bacteria.

Debido a la diversidad de bacterias lácticas que en algunos casos se mantiene y a la presencia de microorganismos con capacidad probiótica en el pulque, así como algunos usos terapéuticos tradicionales adjudicados a esta bebida, se procedió a determinar el potencial probiótico, mediante pruebas *in vitro*, de una colección de 133 cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de distintas muestras de pulques, provenientes de la región de la Mixteca, del municipio de Huajapan de León, Oaxaca. De esta colección se aislaron 15 cepas capaces de resistir condiciones de acidez y presencia de sales biliares. Posteriormente estos aislados fueron evaluados en cuanto a su capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos

patógenos (*E. coli* enteropatógena, *Salmonella enterica* serovar. Typhi, *S. enterica* serovar. Enteritidis, *L. monocytogenes* y *V. cholerae*). A partir de esta evaluación se detectó una cepa (cepa C), identificada por métodos moleculares como *Lactobacillus plantarum*, como aquella con la mejor capacidad inhibitoria contra los cinco patógenos. De esta cepa también se determinó cuantitativamente su resistencia a condiciones de acidez y presencia de sales biliares, obteniéndose valores de desarrollo del orden de 10^8 UFC/mL. La identificación por métodos bioquímicos (sistema API 50 CH) brindó el mismo perfil taxonómico que la identificación molecular. Los resultados obtenidos corroboran la presencia de bacterias ácido lácticas potencialmente probióticas en esta colección, por lo que deben efectuarse evaluaciones *in vivo* con la cepa seleccionada para lograr identificarla como probiótica.

Marco teórico

1. Bacterias ácido lácticas

1.1. Características principales

Se conocen como bacterias ácido lácticas (BAL's) a un grupo de bacterias Gram positivas, con morfología de cocos o bacilos en distintas agrupaciones, capaces de desarrollarse en condiciones de microaerofilia hasta anaerobiosis estricta, con ausencia de actividad de enzima catalasa y de citocromos, y productoras de ácido láctico como uno de sus principales metabolitos (Klein et al., 1998; Von Wright y Axelsson, 2012). Taxonómicamente pertenecen al phylum Firmicutes, clase Bacilli y orden Lactobacillales, dentro del cual se agrupan a las familias *Aerococcaceae*, *Carnobacteriaceae*, *Enterococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* (Von Wright y Axelsson, 2012). Hasta el momento (Marzo 2015) se tienen registrados 45 géneros bajo la denominación de bacterias lácticas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=>

186826&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock, última accesión: 23 marzo 2015).

1.2. Características metabólicas.

Las BAL's poseen requerimientos nutrimentales complejos, dado que no son capaces de sintetizar la mayoría de los compuestos que requieren. Por esta misma razón sólo pueden desarrollarse en medios ricos en carbohidratos, aminoácidos, vitaminas y sales minerales. En función de su carácter quimiorganótrofo, las fuentes de carbono que pueden asimilar son en su mayoría carbohidratos (hexosas, pentosas y algunos disacáridos, principalmente) (Von Wright y Axelsson, 2012). El transporte de hexosas en BAL's está mediado por el sistema fosfo-transferasa-dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP:PTS). Otra vía de transporte es mediante permeasas específicas, como suele suceder con las pentosas y los disacáridos maltosa y sacarosa, aunque en este caso la fosforilación ocurre en el interior de la célula. Para la lactosa ambos sistemas pueden llegar a coexistir. (Kotrba, Inui y Yukawa, 2001; Von Wright y Axelsson, 2012).

Una vez dentro de la célula la fermentación de carbohidratos puede acontecer por la ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas (glucólisis) para BAL's con metabolismo homofermentativo, o por la ruta de la pentosa fosfocetolasa (también llamada ruta del 6-fosfo-gluconato) para BAL's heterofermentativas (Figura 1).

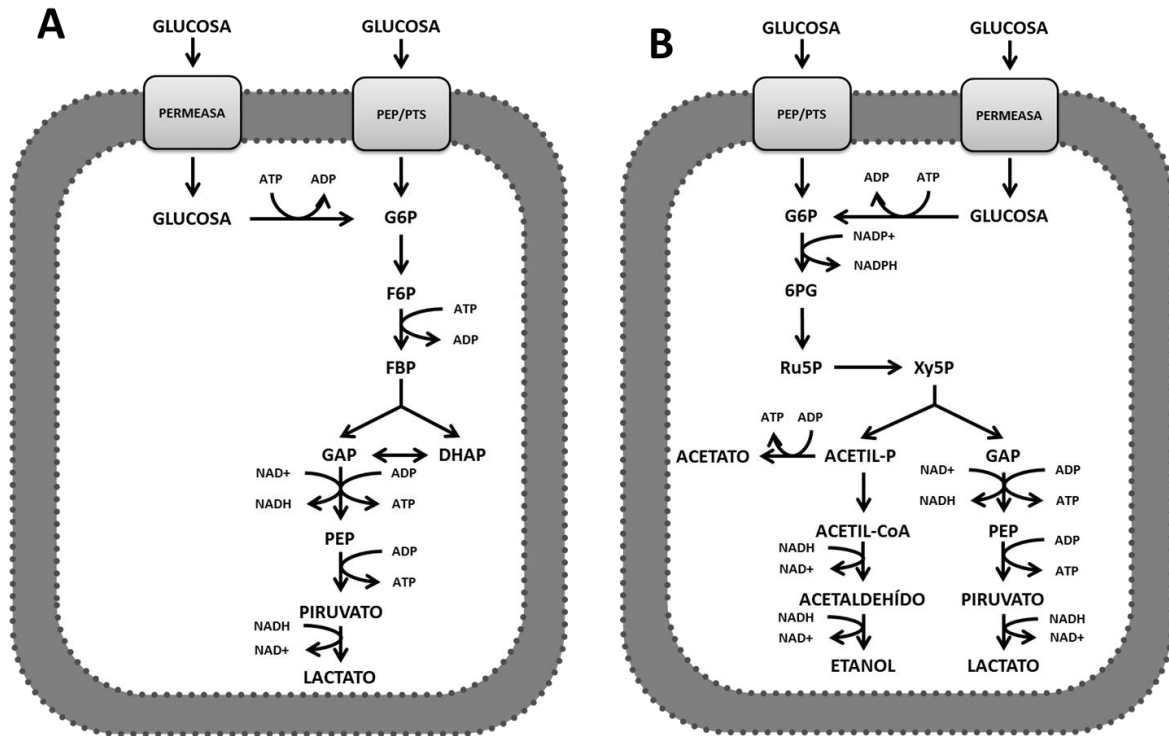


Figura 1. Principales rutas metabólicas para BAL's. A: ruta homofermentativa (glicólisis o ruta de Embden-Meyerhoff-Parnas); B: ruta heterofermentativa (ruta de la pentosa fosfocetolasa o del 6-Fosfo-gluconato). Abreviaturas: G6P, glucosa-6-fosfato; F6P, fructosa-6-fosfato; FBP, fructosa-1,6-bifosfato; GAP, gliceraldehído-3-fosfato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; PEP, fosfoenol piruvato; 6PG, 6-fosfo-gluconato; Ru5P, ribulosa-5-fosfato; Xy5P, xilulosa-5-fosfato (Liu, 2003; Gaspar *et al.*, 2013)

Mediante el metabolismo homofermentativo el único metabolito producido es el ácido láctico (rendimiento de 2 moles de ácido láctico por 1 mol de glucosa), el rendimiento energético es de 2 moles de ATP por mol de glucosa y únicamente pueden ingresar hexosas a esta vía. En cambio por el metabolismo heterofermentativo los productos finales son ácido láctico (1 mol por 1 mol de glucosa), etanol (1 mol por 1 mol de glucosa) y CO₂ (1 mol por 1 mol de glucosa) y el rendimiento energético es de 1 mol de ATP por mol de glucosa, aunque puede aumentar a 2 moles por mol del glucosa si el acetil fosfato es convertido a acetato; a esta vía pueden ingresar tanto hexosas como pentosas y algunos pentitales,

estos últimos dos capaces de ser incorporados a la vía como ribulosa-5-fosfato o xilulosa-5-fosfato, pero sin la formación de CO₂ (Figura 2).

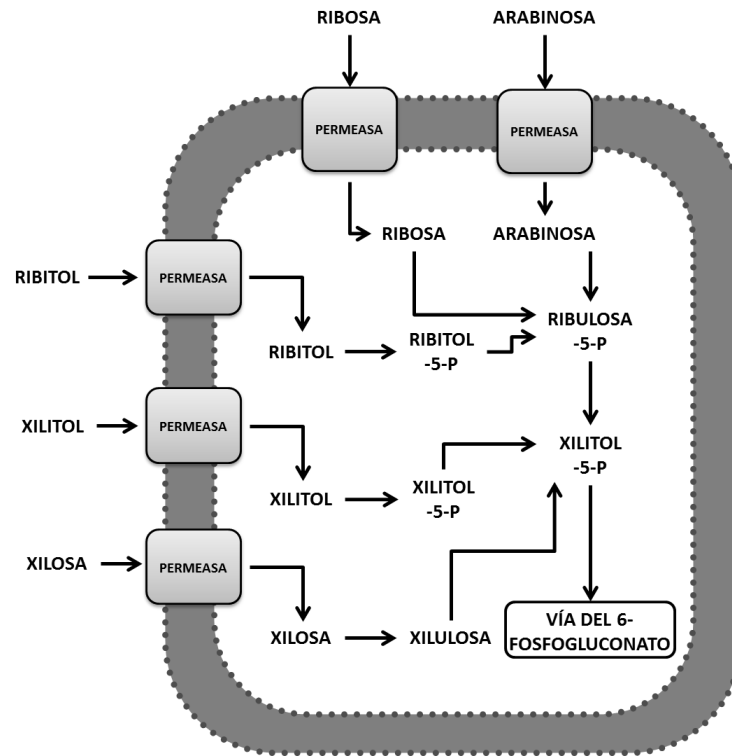


Figura 2. Ingreso de pentosas y pentitales al metabolismo heterofermentativo (Liu, 2003)

En el caso de la galactosa, ésta puede ser metabolizada por la vía de la tagatosa-6-fosfato, si ingresó a la célula por medio de PEP:PTS, para ingresar al metabolismo como triosas-3-fosfato. Si el ingreso es mediante una permeasa específica, la galactosa será metabolizada por la ruta de Leloir, en donde la glucosa-1-fosfato obtenida es transformada en glucosa 6-fosfato. (Figura 3), (Liu, 2003; Gänzle, Vermeulen y Vogel, 2007; Von Wright y Axelsson, 2012; Gaspar *et al.*, 2013).

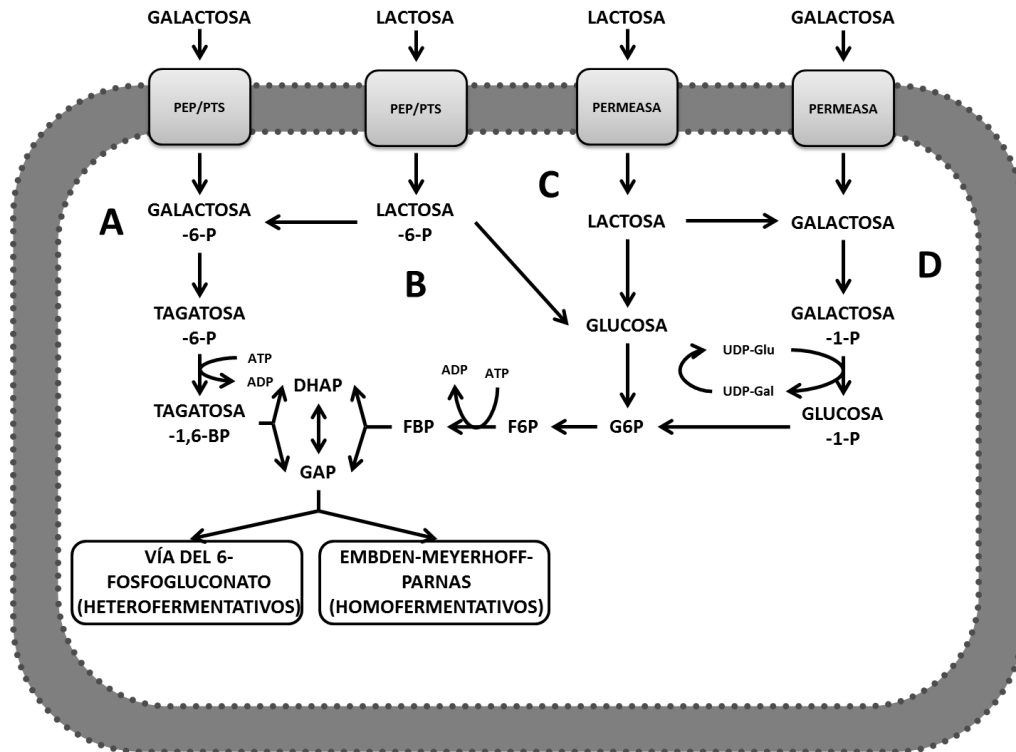


Figura 3. Metabolismo de la galactosa y la lactosa. A: ruta de la tagatosa-6-fosfato; B: metabolismo de la lactosa, mediante su ingreso a la célula por el sistema PEP:PTS y su posterior ruptura por la fosfo- β -D-galactosidasa; C: metabolismo de la lactosa, mediante su ingreso por una permeasa específica y su hidrólisis mediante la β -galactosidasa; D: ruta de Leloir. La galactosa metabolizada ingresará al metabolismo homo- y heterofermentativo como triosas-3-fosfato (Welman y Maddox, 2003).

En función del tipo de fermentación se pueden distinguir tres grupos de fermentación: el Grupo I incluye a todas aquellas especies homofermentativas obligadas, el Grupo II abarca a las especies heterofermentativas facultativas, en tanto que en el Grupo III se encuentran las especies heterofermentativas obligadas (Von Wright y Axelsson, 2012). En la tabla 1 se indican algunas de las especies pertenecientes a cada uno de estos grupos.

Tabla 1. Clasificación de BAL's en función de su tipo de fermentación.

Grupo I		Grupo II	Grupo III	
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Género <i>Pedicoccus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>	Género <i>Leuconostoc</i>
<i>L. delbrueckii</i>	Género <i>Tetragenococcus</i>	<i>L. curvatus</i>	<i>L. bunchneri</i>	Género <i>Weisella</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>L. plantarum</i>	<i>L. fermentum</i>	Género <i>Oenococcus</i>
<i>L. salivarius</i>		<i>L. sakei</i>	<i>L. reuteri</i>	Género <i>Fructobacillus</i>
Género <i>Lactococcus</i>		Género <i>Carnobacterium</i>	<i>L. pontis</i>	

(Barrangou *et al.*, 2012; Huys, Leisner y Björkroth, 2012; Von Wright, 2012; Von Wright y Axelsson, 2012)

Las BAL's con metabolismo homofermentativo y heterofermentativo facultativo son capaces de producir distintos compuestos a partir del piruvato, tales como el acetaldehído, la acetoína, el diacetilo y el 2,3-butanodiol (Figura 4), lo cual representa una característica importante desde el punto de vista tecnológico para la elaboración de algunos alimentos fermentados. El piruvato proviene de la glucólisis, aunque también del metabolismo del citrato, presente en cantidades considerables en leche y productos vegetales. El ingreso a la célula de éste último está mediado por una permeasa específica. Dentro de la célula es descompuesto por la enzima citrato liasa en oxaloacetato y acetato. El primero es descarboxilado por la enzima oxaloacetato descarboxilasa para obtener piruvato y CO₂. Con este aporte adicional de piruvato se pueden obtener distintos compuestos. Por medio de la formación de α -acetolactato y su posterior oxidación se puede obtener diacetilo. La síntesis de acetoína puede efectuarse a partir de la descarboxilación del α -acetolactato o por la reducción del diacetilo. En tanto que el 2,3-butanodiol

proviene de la reducción de la acetoína. También a partir del metabolismo del piruvato pueden obtenerse acetato, formiato, CO₂ y etanol, obteniendo lo que se conoce como fermentación mixta. En ambientes anaeróbicos, mediante la enzima piruvato-formiato liasa, se puede obtener formiato y Acetil-CoA, este último con la posibilidad de ser empleado en la biosíntesis de ácidos grasos o en la formación de acetato y etanol. Para las especies del género *Lactococcus* el piruvato puede ser también oxidado en Acetil-CoA, CO₂ y NADH. En condiciones aeróbicas, el piruvato puede ser oxidado por la enzima piruvato oxidasa para obtener CO₂ y acetato, con la subsecuente formación de H₂O₂. Por medio del metabolismo del piruvato se explica la síntesis de todos estos compuestos que, con excepción del CO₂, presentan actividad antimicrobiana (Liu, 2003; Makras *et al.*, 2006; Gänzle, Vermeulen y Vogel, 2007; Von Wright y Axelsson, 2012).

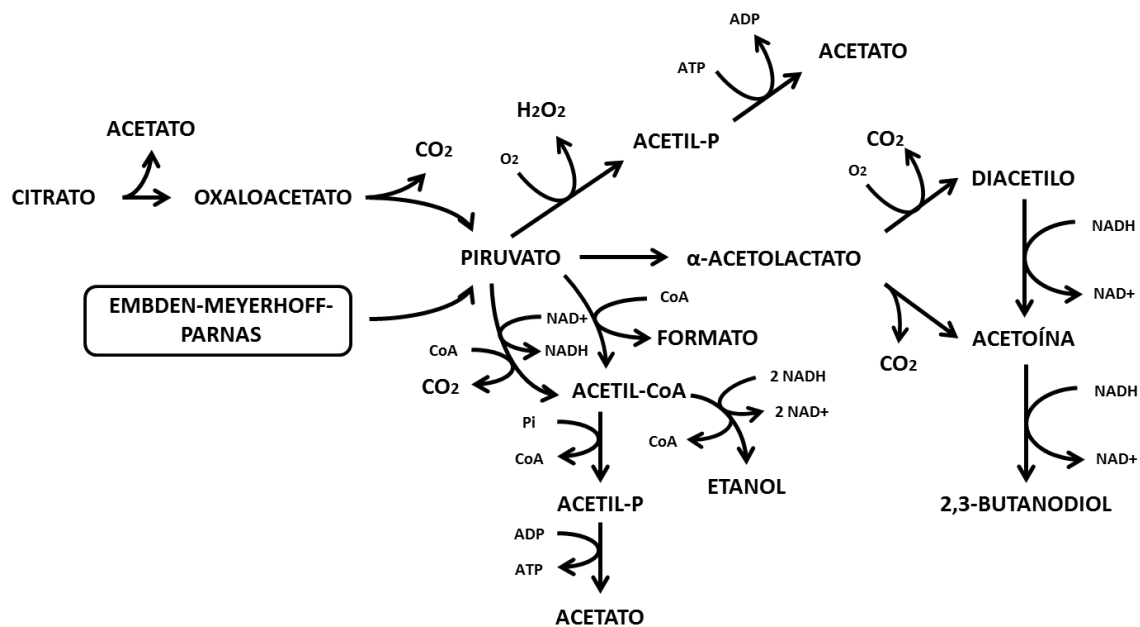


Figura 4. Rutas para la formación de compuestos derivados del piruvato (Liu, 2003; Von Wright y Axelsson, 2012)

En virtud de su auxotrofia a distintos aminoácidos, las BAL's cuentan con diversos sistemas para suplir estas necesidades. Generalmente estos sistemas constan de

peptidasas extra e intracelulares, sistemas transportadores de aminoácidos y oligopéptidos, y proteínas asociadas a membrana con actividad proteolítica. Las especies del género *Lactococcus* cuentan con proteínas de envoltura celular (CEP) con actividad proteolítica, especialmente para caseínas; el transporte de oligopéptidos está determinado por transportadores específicos (Opp, Dpp y DtpT) mientras que para su total degradación cuentan con proteasas intracelulares. En el caso de las especies de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc* la actividad proteolítica está determinada por proteasas extracelulares y peptidasas intracelulares, y el transporte de oligopéptidos y aminoácidos es efectuado por transportadores específicos. En estos últimos la actividad proteolítica es específica, y en algunos casos puede determinar algunas características tanto de la cepa como del producto fermentado (Gänzle, Vermeulen y Vogel, 2007; Von Wright y Axelsson, 2012).

Un aspecto de importancia es la producción de exopolisacáridos (EPS), la cual está asociada, generalmente, a las especies del género *Leuconostoc*. La enzima glucosiltransferasa cuenta con actividad hidrolasa para emplear la sacarosa como sustrato y formar dextranas a partir de glucosa; en tanto que la enzima fructosiltransferasa es capaz de sintetizar fructanas (levanas e inulina) a partir de fructosa residual de la hidrólisis de la sacarosa. (Welman y Maddox, 2003; Gänzle, Vermeulen y Vogel, 2007; Torres-Rodríguez *et al.*, 2014).

1.3. Características genéticas.

El genoma de las BAL's se caracteriza por contar con un tamaño de 1.7 a 3.4 Mbp, con bajo contenido de GC y la presencia de secuencias de inserción y pseudogenes. Igualmente las BAL's cuentan con plásmidos, los cuales pueden representar hasta el 4.8% de su genoma, y que codifican genes involucrados en funciones metabólicas y la resistencia a algunos antibióticos (Makarova *et al.*, 2006; Morelli *et al.*, 2012).

Otra característica importante del genoma de las BAL's reside en su pérdida de genes y su adaptación a ambientes nutrimentalmente ricos. Evolutivamente las BAL's descienden de un ancestro común de la clase Bacilli, posiblemente con un genoma capaz de expresar de 2700 a 3700 proteínas, y probablemente con la presencia de distintos genes para sobrevivir en ambientes aerobios (por ejemplo, citocromos o enzima catalasa), para la biosíntesis de aminoácidos o cofactores o para la esporulación. Sin embargo, la adaptación a ambientes ricos en nutrientes tales como lácteos, vegetales o cárnicos, así como distintas mucosas animales, propició la pérdida de genes y la ganancia de otros genes con funciones de transporte y degradación. La ganancia de estos genes ha estado mediada por fenómenos de transferencia horizontal de genes (THG), principalmente conjugación y transducción, aunque también por fenómenos de replicación de genes y por transposones. La THG también ha estado implicada en la transmisión de resistencia a antibióticos, resistencia a condiciones de acidez y presencia de sales biliares y producción de bacteriocinas (Makarova *et al.*, 2006). En la tabla 2 se presentan algunas especies de BAL's con algunas de las resistencias antes mencionadas.

Tabla 2. Resistencia a antibióticos, acidez y sales biliares en algunas BAL's

Especie	Resistencia		
	Antibióticos	Acidez	Sales biliares
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Apr., Cef., Cip., Clox., Col., Gen., Kan., Nal., Neo., Sulf., Tri., Tet.	Sí	Sí
<i>L. casei</i>	Amp., Apr., Cef., Cip., Col., Gen., Kan., Nal., Neo., Sulf., Tri., Van.	Sí	Sí
<i>L. paracasei</i>	Apr., Cef., Cip., Col., Gen., Kan., Nal., Neo., Sulf., Tri., Van.	Sí	Sí
<i>L. plantarum</i>	Amp., Cip., Col., Clox., Eri., Esp. Gen., Kan., Nal., Neo., Sulf., Tri., Van.	Sí	Sí
<i>L. reuteri</i>	Clor., Eri.	Sí	Sí
<i>L. rhamnosus</i>	Apr., Cef., Cip., Col., Gen., Kan., Nal., Neo., Sulf., Tet., Tri., Van.	Sí	Sí
<i>L. sakei</i>	Tet.,	-	Sí
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Met.	-	-
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-	Sí	Sí
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Van.,	-	-

Abreviaturas: Amp., ampicilina; Apr., apramicina; Cef., cefpodoxima; Cip., ciprofloxacina; Col., colistina; Clor., cloranfenicol; Clox., cloxacilina; Eri., eritromicina; Esp., espectinomicina; Gen., gentamicina; Kan., kanamicina; Met., metilina; Nal., nalidixano; Neo., neomicina; Sulf., sulfametoxazol; Tet., tetraciclina; Tri., Trimetroprim; Van., vancomicina (Mathur y Singh, 2005; Begley, Hill y Gahan, 2006; Ouoba, Lei y Jensen, 2008; Jensen *et al.*, 2012; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012)

2. Probióticos.

2.1. Definición.

La FAO/WHO (2002), ha definido a los probióticos como microorganismos vivos que, administrados en concentraciones adecuadas, pueden proveer de un beneficio a la salud del hospedero. Para este fin se requiere que tales microorganismos cuenten con las siguientes características:

- Resistencia a las condiciones presentes en el tracto gastro-intestinal.
- Capacidad de inhibir la colonización y el desarrollo de microorganismos patógenos.
- Capacidad de adherencia al epitelio intestinal.
- Estimulación de la actividad inmune y mejora de la salud del hospedero.
- Seguros para el consumidor (inocuos).
- Capaces de sobrevivir a lo largo de la vida de anaquel del producto.

Algunos de los microorganismos identificados como probióticos se enlistan en la tabla 3. Es importante resaltar que la mayoría de ellos pertenecen al grupo de las bacterias lácticas.

Tabla 3. Microorganismos reconocidos como probióticos (continuación)

<i>Lactobacillus</i>	L. acidophilus, L. casei, L. crispatus, L. curvatus, L. delbrueckii, L. farciminis, L. fermentum, L. gasseri, L. johnsonii, L. paracasei, L. plantarum, L. reuteri, L. rhamnosus
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. adolescentis, B. animalis, B. bifidum, B. breve, B. infantis, B. lactis, B. longum, B. termophilum</i>
Otras bacterias lácticas	<i>Enterococcus faecium, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, Streptococcus thermophiles, S. diacetylactis, S. intermedius</i>
Otras especies	<i>E. coli</i> cepa Nissle, <i>Saccharomyces boulardii, S. cerevisiae</i>

(Saad *et al.*, 2013).

Los microorganismos probióticos pueden consumirse en alimentos (como nativos en alimentos fermentados o adicionados), o como suplementos alimentarios (encapsulados, en tabletas o en polvo), siendo la primera la vía más común de consumo. Aquellos alimentos con microorganismos probióticos (alimentos probióticos) caen dentro de la clasificación de los alimentos funcionales, los cuales se definen como alimentos capaces de proveer un beneficio a la salud del consumidor. Gracias a sus beneficios, el consumo de alimentos funcionales ha incrementado en todo el mundo. En el caso de los alimentos probióticos, de 2000 a 2010 se registró un aumento de su mercado de 33 mil millones a 176.7 mil millones de dólares, y actualmente comprenden el 70 % del mercado global de alimentos funcionales y el 5 % del mercado global de alimentos (Saad *et al.*, 2013; Mitsuoka, 2014; Tripathi y Giri, 2014)

2.2. Capacidad de resistencia al ambiente gastro-intestinal del hospedero.

Dado que se requiere que los microorganismos probióticos deban permanecer viables a su llegada al intestino del hospedero para brindar su acción, deben contar con mecanismos de resistencia a las dos principales barreras presentes: la acidez del medio estomacal y la presencia de sales biliares en el duodeno. En el

medio estomacal los ácidos sin disociar pueden ingresar al interior de la célula bacteriana, dentro de la cual se disocian y generan un colapso en el gradiente electroquímico de protones, además que el subsecuente cambio del pH del medio afecta la integridad de membrana de la célula y a distintos procesos metabólicos (Pan *et al.*, 2009). Más adelante, en el duodeno, las células se confrontarán a las sales biliares. Las sales biliares se componen de una serie de anillos derivados del colesterol (colato, desoxicolato, quenodesoxicolato o ursodesoxicolato) conjugadas con un aminoácido (glicina o taurina). Si bien su principal función es la de emulsificar lípidos para poder ser metabolizados, también cuentan con actividad antimicrobiana (Maldonado *et al.*, 2011). Debido a su naturaleza anfipática, las sales biliares pueden interactuar con los lípidos en membrana (ácidos grasos, fosfolípidos y glucolípidos), afectando a su integridad y composición y, por consiguiente, aumentando su permeabilidad y afectando los mecanismos transportadores de glucosa (Pía, Pérez y Font, 2006); también, en su forma ácida, poseen la misma acción que los ácidos en su forma no disociada (Begley, Gahan y Hill, 2005).

Ante estas barreras se han descrito distintos mecanismos de resistencia en bacterias lácticas. En tales condiciones de estrés pueden activarse distintos genes involucrados en la síntesis de ácidos teicóicos, con el fin de mantener la integridad de membrana, y en consecuencia disminuir su permeabilidad. Otro mecanismo descrito es la actividad de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), encargada de la hidrólisis del enlace peptídico de las sales biliares con el aminoácido al cual están conjugados (taurina o glicina), lo cual deriva en la pérdida de su capacidad emulsificante y antimicrobiana (Begley, Gahan y Hill, 2005). Así mismo también se han reportado la acción de transportadores multifármaco (MDR), que permiten la salida de sales biliares de la célula (Von Wright y Axelsson, 2012); y la producción de exopolisacáridos para aminorar los daños a membrana producidos por ambos factores (Morelli *et al.*, 2012). En *L. reuteri* se han descrito otros mecanismos que requieren el consumo de protones, y por lo tanto estabilizan el pH intracelular.

Estos mecanismos son: la descarboxilación de glutamato en ácido γ -amino butírico; la desaminación de arginina en citrulina, y la desaminación y descarboxilación de ésta en ornitina; la descarboxilación de histidina en histamina; la actividad de la enzima ureasa; y la desaminación de glutamina en glutamato (Teixeira *et al.*, 2014).

2.3. Capacidad antimicrobiana.

Para preservar el adecuado estado de salud del hospedero, los microorganismos probióticos deben contar con mecanismos que eviten la colonización y el desarrollo de microorganismos patógenos. Dadas las características metabólicas de la mayoría de los probióticos, la producción de ácidos orgánicos es la primera barrera desplegada contra la microbiota patógena. El principal metabolito producido es el ácido láctico, derivado del metabolismo homo- y heterofermentativo; también por la vía heterofermentativa y por el metabolismo del piruvato se produce ácido acético. Si bien el ácido láctico es el más importante debido a las altas concentraciones con que es producido (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012), el pKa del segundo (4.74) permite una mayor acción al inicio del desarrollo del microorganismo productor (Hor y Liong, 2014). También se puede producir ácido fórmico derivado del piruvato, pero su acción antimicrobiana es menor. La acción de los ácidos orgánicos se describió anteriormente (inciso 2.2).

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) proviene del metabolismo del piruvato. Debido a su alta reactividad puede dar lugar a la formación de radicales hidroxilo ($OH\cdot$), los cuales son capaces de inducir daños en membranas y DNA. Su toxicidad se ha reportado efectivamente contra *Salmonella enterica* serovar. Typhimurium, *Staphylococcus aureus*, *E. coli* enteropatógena y *Clostridium perfringens* (Dillon, 2014).

Otros compuestos con actividad antimicrobiana son el diacetilo y sus formas reducidas (acetoína y 2,3-butanodiol), también derivados del metabolismo del

piruvato. Aunque no se han determinado sus mecanismos de acción, hay estudios que revelan su participación como agente antimicrobiano. Estos compuestos son efectivos a altas concentraciones y a pH 4.5 a 6.0. Su mayor potencial de acción se ha observado contra microorganismos Gram-negativos, hongos filamentosos y levaduras (Aunbjerg *et al.*, 2014; Dillon, 2014).

La reuterina (3-hidroxiopropanol) se ha descrito como un antibiótico con una importante actividad antimicrobiana, ya que su efecto inhibitorio se ha registrado para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, esporas, hongos filamentosos, levaduras, protozoarios y virus (Nes, Kjos y Diep, 2012; Dillon, 2014; Garde *et al.*, 2014). La producción de reuterina se describió inicialmente para *L. reuteri*, aunque también se ha detallado para *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. collinoides* y *L. coryniformis* (Nes, Kjos y Diep, 2012). La reuterina es sintetizada por la enzima glicerol deshidratasa a partir del glicerol. El mecanismo de acción de este antibiótico consiste en que el grupo aldehído de la molécula reacciona con los grupos tiol de distintos componentes y proteínas celulares, lo cual induce estrés oxidativo en la célula. Un aspecto importante en su producción en *L. reuteri* es que el co-cultivo con *E. coli* aumenta su producción (Schaefer *et al.*, 2010). La reuteriniclina (aldehído β -hidroxipropiónico), al igual que la reuterina, proviene a partir del metabolismo del glicerol, y su producción se ha descrito sólo en *L. reuteri*. En contraste con la reuterina, su acción es efectiva sólo contra bacterias Gram-positivas. La reuteriniclina actúa como un ionóforo de protones, es decir, aumenta la permeabilidad de membrana para estas partículas, y su mayor actividad se ha observado a pH 2 (Gänzle *et al.*, 2000; Messens y De Vuyst, 2002; Gänzle y Vogel, 2003; Dillon, 2014).

Algunos compuestos con actividad antifúngica han sido aislados, tales como los dipéptidos ciclo (L-Phe-L-Pro) y ciclo (L-Phe-trans-4-OH-L-Pro) y el ácido feniláctico, todos ellos producidos por *L. plantarum*, *L. casei* y *L. coryniformis*, y que han demostrado actividad contra *Penicillium commune*, *Fusarium*

sporotrichoides y distintas especies del género *Aspergillum*. También se ha detallado la producción de ciclo (L-Gly-L-Leu) y de 3-hidroxi-ácidos grasos por distintas cepas de *L. plantarum* (Dalié, Deschamps y Richard-Forget, 2010; Nes, Kjos y Diep, 2012).

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza protéica con actividad antimicrobiana. Debido a que son sintetizadas ribosomalmente durante la fase logarítmica de desarrollo y a que su actividad es altamente específica en cuanto al microorganismo objetivo, no se les reconocen como antibióticos. En función de sus características se reconocen distintos grupos de bacteriocinas (Garneau, Martin y Vederas, 2002; Nes, Kjos, y Diep, 2012; Zacharof y Lovitt, 2012; Zendo, 2013; Pérez, Zendo y Sonomoto, 2014):

- Bacteriocinas de Clase I o Lantibióticos.

Son moléculas de bajo peso molecular (<4 KDa) y termoestables, que cuentan en su estructura con los aminoácidos lantionina, metil-lantionina y D-alanina, debido a modificaciones post-traduccionales. Esta clase de bacteriocinas se divide en dos tipos:

- Lantibióticos tipo A: moléculas elongadas, flexibles, en forma de tornillo, anfipáticas y cargadas positivamente. Su peso molecular ronda entre 2 a 4 KDa y se constituyen de, por lo menos, 34 residuos. Mediante la despolarización de membrana son capaces de formar poros en ésta, lo cual conlleva a la pérdida de moléculas de bajo peso molecular y muerte celular. Pueden subclasificarse en dos subgrupos, en el que el subgrupo AI incluye a aquellas bacteriocinas modificadas por las enzimas LanB y LanC; en tanto que aquellas modificadas por la enzima LanM pertenecen al subgrupo AII.

- Lantibióticos tipo B: son moléculas de estructura globular, con peso entre 2 a 3 KDa y un tamaño no menor a 19 residuos. Su modo de acción se basa en la inhibición de enzimas involucradas en la síntesis de pared celular.
- Bacteriocinas de clase II o no lantibióticos.

Este grupo abarca bacteriocinas termoestables, con un peso menor a 10 KDa, catiónicas, de carácter anfifílico/hidrofóbico, carentes de los aminoácidos característicos de los lantibióticos, y sintetizadas como prebacteriocinas que son activadas por modificaciones post-traduccionales. Su blanco es la membrana celular, en la cual pueden aumentar su permeabilidad, disipar su potencial o formar canales y poros. Se subdividen en cinco clases:

- Subclase IIa: bacteriocinas con una región N-terminal altamente conservada (YGNGVXC), similares a la pediocina, con actividad antilisterial.
- Subclase IIb: bacteriocinas dipeptídicas.
- Subclase IIc: bacteriocinas circulares.
- Subclase IId: bacteriocinas carentes de péptidos líderes.
- Bacteriocinas de clase III.

Son moléculas con peso molecular mayor a 30 KDa, no lantibióticas y no termoestables. En esta categoría sólo están incluidas la helveticina I, producida por *L. helveticus*, y la caseicina 80, producida por *L. casei*.

En la tabla 4 se especifican algunas bacteriocinas, junto con el microorganismo productor

Tabla 4. Bacteriocinas producidas por BAL's

Productor	Bacteriocinas	Clasificación
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocina B	Clase II, subclase c
<i>L. bavaricus</i>	Bavaricina A	Clase II, subclase a
<i>L. casei</i>	Lactocina 705	Clase II, subclase b
<i>L. curvatus</i>	Curvacina A	Clase II, subclase a
<i>L. gasseri</i>	Gasericina A	Clase II, subclase c
<i>L. helveticus</i>	Helveticina I	Clase III
<i>L. johnsonii</i>	Lactacina F	Clase II, subclase b
<i>L. plantarum</i>	Plantaricina W	Clase I
	Plantaricina 423, plantaricina C19,	Clase II, subclase a
	Plantaricina JK, plantaricina EF, plantaricina S.	Clase II, subclase b
<i>L. reuteri</i>	Reutericina 6	Clase II, subclase c
<i>L. sakei</i>	Lactocina S	Clase I
	Bavaricina MN, sakacina P, sakacina 5X, sacacina G, sakacina A	Clase II, subclase a
<i>Lactococcus garviae</i>	Garvicina ML	Clase II, subclase c
<i>L. lactis</i>	Nisina A, nisina Z, nisina Q, nisina F, lacticina 3147, lacticina J46, lacticina 481	Clase I
	Lactococcina MMFII	Clase II, subclase a
	Lactococcina G	Clase II, subclase b
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Leucocina A, leucocina C, mesentericina Y105	Clase II, subclase a
	Leucocina H, Leucociclina Q	Clase II, subclase c

(Gameau, Martin y Vederas, 2002; Messens y De Vuyst, 2002; Nes, Kjos y Djep, 2012; Zacharof y Lovitt, 2012; Zendo, 2013; Pérez, Zendo y Sonomoto, 2014; Yang *et al.*, 2014).

La competencia por sustratos y la mayor capacidad fermentativa de los microorganismos probióticos es otro aspecto que afecta de manera indirecta a la viabilidad de la microbiota patógena. Por una parte se limita la cantidad de sustratos fermentables disponibles y por otra, al aumentar la concentración de la microbiota probiótica, aumentan las barreras desplegadas (Tabasco *et al.*, 2014). Esto es posible debido a la presencia de actividades enzimáticas adicionales a la degradación de mono y disacáridos, es decir, actividades enzimáticas enfocadas a la degradación de carbohidratos complejos. Tales carbohidratos pueden ser oligosacáridos como los galacto-oligosacáridos (GOS), fructo-oligosacáridos (FOS), isomalto-oligosacáridos (IMOS), malto-oligosacáridos (MOS), xilo-oligosacáridos (XOS); o arabinoxilo-oligosacáridos (AXOS); o polisacáridos como la inulina (grado de polimerización mayor a 65 unidades de fructosa), aquellos provenientes de paredes celulares vegetales (celulosa, hemicelulosa o pectina) o almidón en formas resistentes. Los carbohidratos anteriormente descritos no son degradables por las enzimas del tracto gastrointestinal, pero son capaces de estimular el crecimiento y la actividad de determinados microorganismos y modificar la composición de la microbiota intestinal, de manera que estos cambios confieran un impacto positivo a la salud del hospedero. A estos compuestos se les denominan prebióticos, y la capacidad de fermentarlos es una característica deseable en los probióticos (Flint *et al.*, 2012; Saad *et al.*, 2013).

2.4. Capacidad de adhesión.

La importancia de la capacidad de adhesión de los probióticos en el epitelio intestinal reside en que de esta manera podrán brindar al hospedero de sus beneficios por un mayor período de tiempo, ya que podrán confrontar el tránsito intestinal, además de que se ha demostrado que también ejercen un efecto competitivo contra la microbiota patógena por los sitios de colonización. Para ello los probióticos pueden contar con distintos componentes asociados a la membrana celular que pueden acoplarse a la superficie del epitelio intestinal, tales

como proteínas similares a lectinas; proteínas de bajo peso molecular capaces unirse a mucina; proteínas de capa S; proteínas específicas a oligomanósidos, gangliotriosilceramidas y gangliotetraosilceramidas; y ácidos lipoteicóicos. Las bacterias lácticas son capaces de estimular la producción de distintas mucinas como MUC2 y MUC3, las cuales disminuyen la capacidad de adhesión de distintos patógenos (Servin, 2003). Adicionalmente, los agentes antimicrobianos producidos afectan negativamente esta capacidad en patógenos. Sin embargo la capacidad de adhesión y la competición varían en cuanto a las cepas, y no necesariamente el grado de adhesión es proporcional al grado de inhibición de desarrollo del patógeno (Collado, Meriluoto y Salminen, 2007; Tabasco *et al.*, 2014).

2.5. Efectos en la salud del hospedero.

Otra de las características esenciales de los microorganismo probióticos es la mejora en la salud del consumidor. Además de la actividad antimicrobiana y la capacidad de adhesión, este efecto está determinado por la estimulación y modulación de la actividad inmune. Para que sean llevadas a cabo, en primer lugar debe existir interacción entre las células del epitelio intestinal y las células del sistema inmune con las células probióticas, la cual está dada por la unión con receptores en la superficie de células del epitelio intestinal, el transporte de los probióticos a las células del sistema inmune, o por interacción con dendritas de las células presentadoras de antígeno (células dendríticas o DC) en la lámina propia. Esta interacción incide en una cascada de eventos inmunológicos que tienen diversos efectos tales como: estimulación en la producción de inmunoglobulinas (Ig) A y G; aumento en la actividad fagocítica de neutrófilos; aumento en la actividad citotóxica de células NK; actividad antiapoptótica por la producción de proteínas antiapoptóticas (Akt) y bloqueo en la producción del factor de necrosis tumoral (TNF)- α ; maduración de DC; disminución en la producción de interleucinas (IL) proinflamatorias (IL-2, IL-6, IL-12, IL-23 e IL-27); aumento de la secreción de interferón (IFN)- γ e IL-10 (antiinflamatoria), por la estimulación de receptores tipo

Toll (TLR) 2 debido a los ácidos teicóicos presentes en la membrana de bacterias Gram-positivas; desarrollo de placas de Peyer y células B y T; y la actividad antiinflamatoria debida al bloqueo en la producción del factor nuclear (NF)- κ B y la estimulación de receptores tipo Nod (NLR). Gracias a esta actividad ha sido posible tratar distintos padecimientos intestinales, tales como colitis ulcerativa, pouchitis post-quirúrgica, enfermedad de Crohn, síndrome de intestino irritable, colitis necrotizante y distintos tipos de diarrea (por *Clostridium difficile*, debida a rotavirus, post-quirúrgica y debida al uso prolongado de antibióticos (Saad *et al.*, 2013; Vieira, Teixeira y Martins, 2013).

En el caso de tratamiento de alergias se han observado resultados favorables con el uso de probióticos, especialmente en el tratamiento de dermatitis atópica, esto debido a la disminución en la actividad de células Th2, implicadas en la producción de IgG1, IgE e IL-4, sin embargo más estudios deben llevarse a cabo en cuanto a sus efectos y los mecanismos responsables (Gourbeyre, Denery y Bodinier, 2011).

Otro efecto relacionado ha sido el empleo de probióticos para el tratamiento de la obesidad y desnutrición, puesto que la disbiosis presente en estas condiciones es un factor importante para el desarrollo de estos padecimientos (Bienenstock *et al.*, 2013).

3. Pulque

3.1. Definición

El pulque es una bebida alcohólica no destilada obtenida por la fermentación espontánea de la savia o aguamiel, obtenido de distintas especies del género *Agave* (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2004; 2008). Se caracteriza por ser una bebida de bajo contenido alcohólico, no clarificada, de color blanco, ácida y de aspecto viscoso (Banco de Normas Mexicanas, 2010a) El sustrato para la fermentación del pulque, el aguamiel, es el jugo que se obtiene mediante el raspado previo del cajete o cavidad central del maguey pulquero, que se

caracteriza por ser un líquido traslúcido de color ambarino y de olor y sabor característicos (Banco de Normas Mexicanas, 2010b).

3.2. Proceso de producción del pulque

El proceso de producción tradicional del pulque parte de la extracción del aguamiel, el cual se obtiene principalmente de las especies *Agave americana*, *A. atrovirens*, *A. mapisaga* y *A. salmiana*. Usualmente suelen crecer en suelos secos, climas fríos y en altitudes entre los 1800 y 2700 msn, y de las cuales se extrae un aguamiel de alta calidad debido a su alto contenido de azúcares. Sin embargo, también se puede extraer de otras especies tales como *A. altísima*, *A. compliata*, *A. ferox*, *A. gracillispina*, *A. hookeri*, *A. lehmanii*, *A. malliflua*, *A. teometl*, *A. quitifera* y *A. weberi*. Éstas otras especies suelen producir un aguamiel con bajo contenido de azúcares (baja calidad), ya que suelen crecer en zonas de baja altitud, de suelo húmedo y clima templado. Por estos motivos la principal zona de cultivo del maguey para la extracción de aguamiel se localiza en los estados de Hidalgo, Estado de México, Tlaxcala y en algunas partes del Distrito Federal, Michoacán, Morelos, Puebla y Querétaro (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Ramírez, 2010; Escalante *et al.*, 2012).

La extracción de aguamiel se efectúa una vez que la planta está lista para la floración (se dice que el maguey “está al hilo”), lo cual sucede al haber alcanzado una edad de entre 6 y hasta 15 años de edad. En este momento el maguey producirá su inflorescencia, conocida como quiote (del náhuatl *quiotl*-tallo o brote), que consiste en un tallo de hasta 6 m de altura y en cuyos extremos brotarán las flores. Las características que distinguen a un maguey al hilo son: afilamiento de la penca central, cogollo o meyolote (del náhuatl *metl*-maguey y *yolotl*-corazón); hojas basales que han perdido las espinas en sus bordes en la parte inferior; espinas más cercanas a la hoja central endurecidas y dirigidas hacia arriba; y púas terminales de las pencas y del meyolote más oscuras, el cual debe ser eliminado antes de que brote. La maduración varía en función de la especie, las condiciones

climatológicas y la presencia de nutrientes en el suelo (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).

Para la recolección del aguamiel se debe efectuar primero una operación denominada capado o castrado, que consiste en retirar tanto algunas pencas centrales como la piña (también llamada huevo o cogollo), para dejar en su lugar una cavidad conocida como cajete y en la cual se acumula la savia de la planta. Para esta operación se emplea una herramienta denominada “barreta”, que consiste en una hoja afilada al extremo de un mango largo de madera. El encargado de ejecutar esta operación y las subsecuentes es llamado “tlachiquero” (del náhuatl *tlachiqui*-raspador de maguey). Dado que la planta acumula nutrientes y azúcares para que brote el qurote, ésta muere tras su período de floración, por lo que si el capado se efectúa una vez que brotó la producción es nula, pero si éste se efectúa antes del estado óptimo de madurez, se obtiene un aguamiel de muy baja calidad y con escasa producción. El proceso de capado se efectúa al inicio de la primavera o a finales del otoño (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Ramírez *et al.*, 2004; Alemán *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2012).

A continuación sigue un proceso de añejamiento, en el que las pencas centrales restantes alcanzan su mayor grado de maduración y el aguamiel aumenta su concentración de azúcares (7 a 14 %). Este proceso puede durar unos cuantos días o extenderse hasta un año, y finaliza con la aparición de manchas oscuras en las pencas. Esto da pie a efectuar la operación de picazón, en la cual se horada más el cajete y se raspan sus paredes ligeramente con un instrumento llamado “raspador”, que consiste en una hoja metálica afilada y curva. A partir de este momento comienza la producción de aguamiel, el cual debe recolectarse dos veces al día, o inclusive tres si es temporada de lluvias, y tras la última recolección se repite el raspado, para evitar la regeneración del tejido del cajete y promover la liberación de aguamiel. Para su recolección, tradicionalmente se emplea un recipiente largo y oblongo denominado acocote (del náhuatl *atl*-agua y *cocotli*-

conducto), que consiste en el fruto seco y hueco, horadado en los extremos, de la planta *Lagenaria siceraria*, aunque en los últimos años, en algunas regiones, han sido sustituidos por botellas de plástico de PET. En ambos casos la recolección se efectúa por succión, y su contenido se puede depositar en bolsas compuestas por piel de cabra o cerdo curadas (llamadas odres), en recipientes de madera (llamados castañas), en cubetas de plástico o en bidones de plástico. El tiempo de recolección puede durar entre 4 y 6 meses, al final de los cuales habrá producido más de 1000 L de aguamiel, con un promedio de 4 a 6 L/día. Finalizado este período, la planta muere por falta de nutrientes (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Ramírez *et al.*, 2004; Alemán *et al.*, 2012; Escalante *et al.*, 2012).

Tras recolectarse el aguamiel, éste es transportado hasta el tinacal, lugar en donde se lleva a cabo su fermentación y que procede de la siguiente manera: primero se vierten de 10 a 15 L de aguamiel en una tina, con capacidad de hasta 1000 L y se le adiciona una porción de pulque previamente fermentado, o bien se le deja fermentar espontáneamente. La primera fermentación puede durar entre 1 semana en verano o hasta 4 semanas en invierno y se lleva a cabo hasta que sean detectados sabores alcohólicos y acéticos y se presente una capa blanca sobrenadante denominada “zurrón”. Posteriormente se llena la totalidad del volumen de la tina con aguamiel fresco y se le deja fermentar, agitando ligeramente para distribuir homogéneamente el CO₂, hasta que aparece nuevamente el zurrón, el cual debe ser retirado. De esta manera se obtiene el iniciador de la fermentación. Éste se vacía en otras tinajas de fermentación para repetir el proceso (proceso conocido como “tirar puntas”), en cantidades que suelen variar en función de la temporada del año, la capacidad del tinacal y la experiencia del tlachiquero (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Ramírez *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2012)

3.3. Características fisicoquímicas del aguamiel y el pulque.

La NMX-V-022-1972 distingue dos clases de aguamiel con un solo grado de calidad, cuyas características se indican en la tabla 5. Esta información resulta importante dado que explica las características del producto final en la elaboración del pulque. De acuerdo a la NMX-V-037, en función de su producción se reconocen dos tipos de pulque: el pulque de puntas o semilla, que está destinado como cultivo iniciador de la fermentación y que se obtiene de las primeras tinas en el proceso fermentativo, empleando como materia prima el aguamiel de Tipo I; y el pulque comercial, elaborado a partir de cualquier tipo de aguamiel. Por otra parte, en función de la calidad del producto final, pueden distinguirse entre el pulque fino, el cual es producido a partir de aguamiel de alta calidad (alto contenido en azúcares o Tipo I); y el pulque tlachique, elaborado de aguamiel de baja calidad (bajo contenido de azúcares o Tipo II) (Escalante *et al.*, 2012). Las características de ambos tipos de pulque se desglosan en la tabla 6.

Tabla 5. Características de los distintos tipos de aguamiel, de acuerdo a la NMX-V-022-1972

Especificaciones	Tipo I		Tipo II
	Mínimo	Máximo	Menor de:
pH	6.6	7.5	4.5
Densidad en grados Baumé (Bé)	5.0	7.0	4.5
Índice de refracción con el refractómetro a 20°C	59	100	27
Sólidos totales (g/100 mL)	13	17	7
Azúcares reductores totales (en glucosa) (g/100 mL)	8	12	6
Azúcares reductores directos (en glucosa) (g/100 mL)	2	3	3
Gomas (en glucosa) (g/100 mL)	2	6	0.2
Proteínas (mg/100 mL)	300	600	100
Cenizas (mg/100 mL)	300	430	180
Acidez (como ácido láctico) (mg/100 mL)	0.90	1.03	4.00

(Banco de Normas Mexicanas, 2010a).

Tabla 6. Parámetros fisicoquímicos del pulque, de acuerdo a la NMX-V-037-1972

Especificación	Tipo I		Tipo II	
	Mínimo	Máximo	Mínimo	Máximo
Grado refractométrico (Refractómetro de inmersión) a 20°C	32	34.5	25	-
Índice de refracción (refractómetro de inmersión) a 20°C	1.3390	1.3406	1.3365	1.3380
pH	3.7	4.2	3.5	4.0
Acidez total (ácido láctico) (g/100 mL)	0.40	0.75	0.40	0.70
Reductores totales (glucosa) (g/100 mL)	0.10	0.80	0.20	0.50
Grado alcohólico (% alcohol v/v)	6.0	9.0	4.0	6.0

(Banco de Normas Mexicanas, 2010b).

Una característica fundamental del pulque es su viscosidad, debida a la presencia de exopolisacáridos producidos por distintas especies del género *Leuconostoc*. Se ha reportado la presencia de un exopolisacárido compuesto primordialmente de enlaces α -(1→6) D-Glcp con ramificaciones en α -(1→3) D-Glcp, producido por una glucosiltransferasa (GTF) de *L. mesenteroides* asociada a pared celular. Recientemente se caracterizaron tres nuevos exopolisacáridos: un polisacárido lineal principalmente compuesto de enlaces α -(1→6) D-Glcp con ramificaciones en α -(1→2) y α -(1→3), producido tanto por una GTF soluble como por una asociada a pared celular de *L. kimchii* cepa EPSA; un polisacárido lineal principalmente compuesto de enlaces α -(1→6) D-Glcp (dextrana tipo I) con pocas ramificaciones α -(1→3), producido por una GTF soluble de *L. kimchii* cepa EPSB; y una mezcla polimérica compuesta por cadenas lineares de enlaces β -(2→6) D-fructofuranosil (levana) en un 79%, y un 21% de dextrana tipo I, sintetizadas por una GTF asociada a pared celular de *L. kimchii* cepa EPSB (Torres-Rodríguez *et al.*, 2014).

3.4. Características nutrimentales del pulque y el aguamiel

Sanchez-Marroquín efectuó uno de los análisis nutrimentales más importantes del pulque y el aguamiel, cuyos datos se muestran en la tabla 7. Por otra parte la composición de aminoácidos esenciales en el pulque se describe en la tabla 8. Se destaca que el pulque, a pesar de su bajo aporte proteínico, es una buena fuente de triptófano, lisina y aminoácidos azufrados.

En algunas regiones del país el pulque es una de las fuentes más importantes de energía, aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. En un estudio realizado en poblaciones del Estado de México, se registró que el consumo diario de 500 mL de pulque natural aportó 215 Kcal, 45% de ácido ascórbico, 10% de niacina, 7% de tiamina, 6% de riboflavina, 15% de hierro y cantidades importantes de lisina y triptófano (Escalante *et al.*, 2012).

Tabla 7. Análisis nutrimental de distintas clases de pulque, por cada 100 g

Componentes	Pulque (Hidalgo)	Pulque (México)	Pulque tlachique
Humedad (g)	97.00	98.30	97.30
Proteína (g)	0.44	0.37	0.20
Cenizas (g)	-	0.20	0.20
Extracto nitrogenado (g)	-	1.13	2.50
Calcio (mg)	10.00	11.00	10.00
Fósforo (mg)	10.00	6.00	10.00
Hierro (mg)	0.70	0.70	-
Tiamina (mg)	0.02	0.02	0.03
Riboflavina (mg)	0.02	0.03	0.02
Niacina (mg)	0.30	0.35	0.15
Ácido ascórbico (mg)	6.20	5.10	4.60

(Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).

Tabla 8. Perfil de aminoácidos del pulque

Humedad (g/100g)	Contenido proteínico (g/100g)	Contenido de aminoácidos (g/16 g N)										
		Ile	Leu	Lys	Met	Cys	Phe	Tyr	Thr	Trp	Val	His
98.90	0.27	4.04	8.65	1.76	1.12	1.59	6.45	2.76	4.21	2.35	5.12	2.01

(Morales, Camacho y Bourges, 2005).

El aporte energético y nutrimental del pulque puede aumentar si éste se cura, es decir, si se prepara mezclado con frutas, verduras, cereales, granos, semillas, ingredientes lácteos u otros productos de origen animal, además de cambiar sustancialmente su perfil sensorial.

3.5. Características microbiológicas del pulque y el aguamiel.

Las características fisicoquímicas, nutrimentales y sensoriales del pulque son debidas a los procesos fermentativos que se desarrollan en el aguamiel. Diversos estudios llevados a cabo por Sánchez-Marroquín respecto de la microbiota del pulque describieron que los microorganismos más importantes en su proceso fermentativo son las especies pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Lactobacillus*, dado que son las responsables de las fermentaciones viscosa y ácidas, respectivamente, en tanto que la fermentación alcohólica está dada por *Zymomonas mobilis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Ramírez *et al.*, 2004; Escalante *et al.*, 2004; 2012). En las tablas 9 y 10 se indican las especies identificadas actualmente dentro de la microbiota del pulque.

Tabla 9. Poblaciones bacterianas presentes en aguamiel y en pulque

Clasificación	Especies	Fase de la fermentación			
		Aguamiel	Pulque (inoculación)	Pulque (inicio)	Pulque (final)
α-Proteobacterias/ Rhodospirillales	<i>Acetobacter malorum</i> ²		*	*	*
	<i>A. orientales</i> ²				*
	<i>A. pomorium</i> ¹				*

Tabla 9. Poblaciones bacterianas presentes en aguamiel y en pulque (continuación)

α-Proteobacterias/ Rhodospirillales	<i>Gluconobacter oxydans</i> ¹				*
α-Proteobacterias/ Sphingomonadales	<i>Zymomonas mobilis</i> spp. <i>pomaceae</i> ²		*	*	*
γ-Proteobacterias/ Enterobacteriales	<i>Citrobacter</i> spp. ²	*			
	<i>Enterobacter</i> spp. ²	*	*		
	<i>E. agglomerans</i> ²		*	*	
	<i>Erwinia rhapontici</i> ²	*			
	<i>Hafnia alvei</i> ^{1,2}				*
	<i>Kluyvera ascorbata</i> ²		*		*
	<i>K. cochleae</i> ²	*	*		
	<i>Providencia</i> spp. ²				*
γ-Proteobacterias/ Pseudomonadales	<i>Acinetobacter</i> <i>radioresistens</i> ²	*	*	*	
γ-Proteobacterias/ Xantomonadales	<i>Sterotrophomonas</i> spp. ²		*		
Actinobacterias	<i>Microbacterium</i> <i>arborescens</i> ¹				*
Flavobacterias	<i>Chryseobacterium</i> spp. ²				*
	<i>Flavobacterium</i> <i>johnsoniae</i> ¹				*
Firmicutes/ Bacillales	<i>Bacillus</i> sp. ²				*
	<i>B. licheniformis</i> ²		*		
Firmicutes/ Lactobacillales	<i>Lactobacillus</i> spp. AC07 ²				*
	<i>Lactobacillus</i> spp. ASF360 ¹		*	*	
	<i>Lactobacillus</i> spp. Y10 ²				*
	<i>L. acetotolerans</i> ¹				*
	<i>L. acidophilus</i> ^{1,2}			*	*
	<i>L. hilgardii</i> ^{1,2}		*	*	
	<i>L. paracollinoides</i> ²				*
	<i>L. sanfranciscensis</i> ²			*	

Tabla 9. Poblaciones bacterianas presentes en aguamiel y en pulque (continuación)

Firmicutes/ Lactobacillales	<i>Lactococcus</i> spp. ²			*	
	<i>L. lactis</i> ²	*	*		
	<i>L. lactis</i> spp. <i>cremoris</i> ²		*	*	*
	<i>Leuconostoc citreum</i> ²	*	*	*	*
	<i>L. kefir</i> ²				*
	<i>L. kimchi</i> ²	*	*		
	<i>L. gasicomitatum</i> ²		*		
	<i>L. mesenteroides</i> ^{1,2}	*	*	*	*
	<i>L. plantarum</i> ^{1,2}				*
	<i>L. pseudomesenteroides</i> ^{1,2}		*	*	
	<i>Pediococcus urinaeequi</i> ²			*	
	<i>Streptococcus devriesei</i> ²	*			
Clonas bacterianas no cultivables	BANW647 ²	*	*	*	
	P-2988-9F2 ²				*
	rRNA342 ²				*

1: (Escalante *et al.*, 2004). 2: (Escalante *et al.*, 2008).

Tabla 10. Poblaciones de levaduras presentes en pulque

Especies	Fase de la fermentación
<i>Candida</i> spp. ¹	Inicio de la fermentación
<i>C. parapsilosis</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>C. lusitaniae</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>K. lactis</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>Hanseniaspora uvarum</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>Pichia</i> spp. ¹	Inicio de la fermentación
<i>P. guilliermondii</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>Saccharomyces bayanus</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>S. cerevisiae</i> ²	Inicio y final de la fermentación
<i>S. paradoxus</i> ¹	Inicio de la fermentación
<i>Torulasporea delbrueckii</i> ¹	Inicio de la fermentación

1: (Lappe-Oliveras *et al.*, 2008). 2: (Escalante *et al.*, 2008).

Del análisis de muestras de pulque procedentes de Huitzilac, en el estado de Morelos, Tizayuca, en el estado de Hidalgo, y de Aculco, en el Estado de México, fue posible determinar las especies bacterianas presentes mediante técnicas independientes del cultivo. Los resultados obtenidos revelaron aquellos grupos con un importante predominio en el pulque, tales como las bacterias lácticas, (entre las que destacan *L. acidophilus* y *L. mesenteroides*), y también α y β -Proteobacterias (Escalante *et al.*, 2004).

Por otra parte, del análisis de una muestra de aguamiel y de pulque de Huitzilac, por técnicas dependientes e independientes del cultivo, se determinó la dinámica de crecimiento durante el proceso fermentativo. En el aguamiel las especies pertenecientes al género *Leuconostoc*, *Lactococcus lactis* y las γ -Proteobacterias (Enterobacteriales y Pseudomonadales) constituyen su microbiota nativa, pero tras la inoculación con una muestra de pulque previamente fermentada las especies pertenecientes al género *Lactobacillus* predominan durante la fermentación, junto con *Zymomonas mobilis*, bacterias del género *Bacillus*, γ -Proteobacterias-Xantomadales y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Conforme avanza la fermentación disminuyen las poblaciones de γ -Proteobacterias, aparecen bacterias ácido-acéticas pertenecientes al género *Acetobacter* y aumentan las poblaciones de *Lactobacillus*, *Z. mobilis* y de *S. cerevisiae*, hasta que al final de la fermentación predominan estos últimos (Escalante *et al.*, 2008).

En cuanto a las levaduras, Lappe-Oliveras *et al.*, (2008), reportaron otras especies de levaduras distintas a *S. cerevisiae*, como se especifica en la tabla 10.

Las especies del género *Leuconostoc* son las encargadas de iniciar el proceso fermentativo, evacuando el oxígeno por producción de CO₂, produciendo exopolisacáridos e iniciando la acidificación del medio, hasta un pH aproximado de 5.8. En este punto la fermentación ácida es llevada a cabo por las bacterias del género *Lactobacillus*, al mismo tiempo que *Z. mobilis* y *S. cerevisiae* ejecutan la

fermentación alcohólica, hasta alcanzar los valores de pH y de concentración de etanol aproximados (Ramírez *et al.*, 2004)

3.6. Efectos benéficos a la salud asociado al consumo de pulque.

Junto con los aspectos rituales, nutrimentales y sensoriales, el consumo del pulque desde épocas prehispánicas está justificado por sus usos terapéuticos. Algunos de estos distintos usos son (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012):

- Tónico para reanimar a quienes han recaído de alguna enfermedad, al ser mezclado con una vaina de chile (*Capsicum annuum*) y semillas de calabaza (*Cucurbita* spp.) (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).
- En el alivio de dolores de pecho, espalda y estómago, al mezclarse con la medicina denominada *chichicpatli* (corteza de *Garrya laurifolia* y *G. ovata*) (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012).
- Auxiliar en el tratamiento de dispepsia, diarrea, gastralgia, anorexia, astenia (debilitamiento), vértigo, neuralgia, tuberculosis, infecciones urinales, tifo, pitiriasis (descamación y aparición de manchas en la piel), sífilis y gonorrea (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012).
- Diurético (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012).
- La administración de pulque caliente sirve como diaforético, expectorante y agente para aliviar la tos (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012).
- Algunos estudios destacan un mayor desarrollo de niños recién nacidos y lactantes con el consumo de cantidades moderadas de pulque (menor a 500 mL por día) por parte de la madre, gracias a su aporte nutrimental (Backstrand *et al.*, 2001; 2004).

- El sedimento del pulque es útil para el tratamiento de heridas (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003).
- Auxiliar en el tratamiento de anemias, gracias a su aporte de hierro y la presencia de ácido ascórbico y etanol, que favorecen su absorción (Godoy, Herrera y Ulloa, 2003; Escalante *et al.*, 2012).

3.7. Justificación.

En el grupo de investigación (M en B Martha Giles Gómez, Facultad de Química, UNAM - Dr. Adelfo Escalante, IBT-UNAM) se ha estudiado la diversidad genética, metabólica y fisiológica de la microbiota del pulque. En este contexto se han realizado dos estudios en los que se analizó la diversidad bacteriana presente en muestras de pulque de diferente origen geográfico (Escalante *et al.*, 2004) así como el análisis de los cambios en diversidad presente durante una fermentación desarrollada en laboratorio (Escalante *et al.*, 2008). Los resultados de estos estudios demostraron la presencia de una diversidad de BAL's muy importante, destacando la presencia de diferentes especies de *Lactobacillus*, entre las que se encuentran de forma abundante *L. acidophilus*.

Debido a que diversas cepas de estas BAL's son utilizadas comercialmente como probióticos y a que existen una tradición de que el consumo de esta bebida proporciona diversos beneficios a la salud intestinal del consumidor, estudios recientes de nuestro grupo se han enfocado al aislamiento de BAL's con potencial probiótico y su posterior caracterización, con la finalidad de aportar evidencia científica que permita soportar los beneficios hacia la salud humana asociados a BAL's involucradas en el desarrollo de la fermentación y que alcanzan el intestino al ser consumida la bebida. Campos (2010), analizó la población de bacterias lácticas de pulque proveniente de Hutizilac, en distintas fases de la fermentación (semilla y con 3 y 6 h de fermentación), con el objetivo de encontrar cepas potencialmente probióticas. Tras una serie de análisis *in vitro* para evaluar la

resistencia a condiciones de acidez (pH 3.5) y presencia de sales biliares (0.3%), de un total de 240 cepas aisladas se seleccionaron 13 cepas, todas ellas con morfología de diplococos, Gram-positivas y catalasa negativa. La identificación taxonómica por medios moleculares permitió establecer la identidad de estas cepas como *Leuconostoc durionis* (3 cepas) y *L. mesenteroides* (10 cepas) Al evaluar cualitativamente la capacidad antimicrobiana de esta selección contra *E. coli* enteropatógena, *S. enterica* serovar. Typhi, *S. enterica* serovar. Enteritidis y *L. monocytogenes* se observó actividad entre todas ellas, en especial de las cepas etiquetadas como P45 y 3h38, identificadas como *L. mesenteroides* y *L. mesenteroides* spp. *mesenteroides*. Por otra parte Matus (2011), evaluó cuantitativamente el desarrollo y la actividad antimicrobiana de estas 13 cepas contra los mismos patógenos, definiendo a la cepa de *L. mesenteroides* P45 como aquella como mejor candidata a poseer potencial probiótico, Dicha cepa fue empleada para determinar su actividad inhibitoria en modelos animales (ratones Balb/c machos y hembras), logrando establecer que es capaz de disminuir la infección por *S. enterica* serovar. Typhimurium. Igualmente se analizó el sobrenadante de un cultivo de esta cepa, atribuyendo su actividad a la presencia de ácidos orgánicos y a la probable presencia de una bacteriocina. Recientemente se llevó a cabo la secuenciación y el ensamblaje del genoma completo de *L. mesenteroides* cepa P45, el cual fue depositado en la base de datos de GeneBank (Riveros-McKay *et al.*, 2014).

Dados estos antecedentes, el presente trabajo surge de una colaboración solicitada por la Universidad de la Mixteca, en la cual el Dr. Rogelio Valadez se acercó al grupo para solicitar en un principio el apoyo para la purificación e identificación de una colección de diversos aislados de BAL's de muestras de pulque de la región de la Mixteca Oaxaqueña. Una vez concluida esta etapa, se comenzó a evaluar el posible potencial probiótico de algunas de las BAL's de esta colección. La presente tesis describe los resultados de este estudio.

Hipótesis

A lo largo de la historia se han descrito en el pulque distintas propiedades terapéuticas; además se ha demostrado que en pulque proveniente de Huitzilac, Morelos, se han detectado bacterias ácido lácticas con capacidad probiótica, y que en muestras de pulques con distinto origen geográfico se ha determinado que la presencia de algunas especies de este grupo se mantiene constante, entre las cuales se han descrito algunas cepas como probióticas. Por lo tanto se postula que en el pulque de la región de la Mixteca Oaxaqueña habrá cepas de BAL's potencialmente probióticas.

Objetivo general

Determinar el potencial probiótico de una colección de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulque, colectadas en la Mixteca Oaxaqueña.

Objetivos particulares

- Construir una réplica de dicha colección, depositada en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM.
- Caracterizar las morfologías coloniales y microscópicas y la actividad de catalasa de estas cepas.
- Evaluar cualitativa y cuantitativamente su resistencia a condiciones de acidez y presencia de sales biliares.
- Evaluar cualitativamente su capacidad de inhibición del crecimiento de algunos microorganismos patógenos.
- Identificar las cepas con el sistema bioquímico miniaturizado API 50 CHL.
- Identificar mediante análisis de la secuencia del gen 16S rDNA las cepas que presenten una probable actividad probiótica.

Materiales y metodología

El esquema de trabajo que se llevó a cabo en el proyecto se describe en la figura 5, en el cual las cepas de la colección fueron clasificadas como sin potencial probiótico, potencialmente probióticas y aquella con el mayor potencial probiótico.

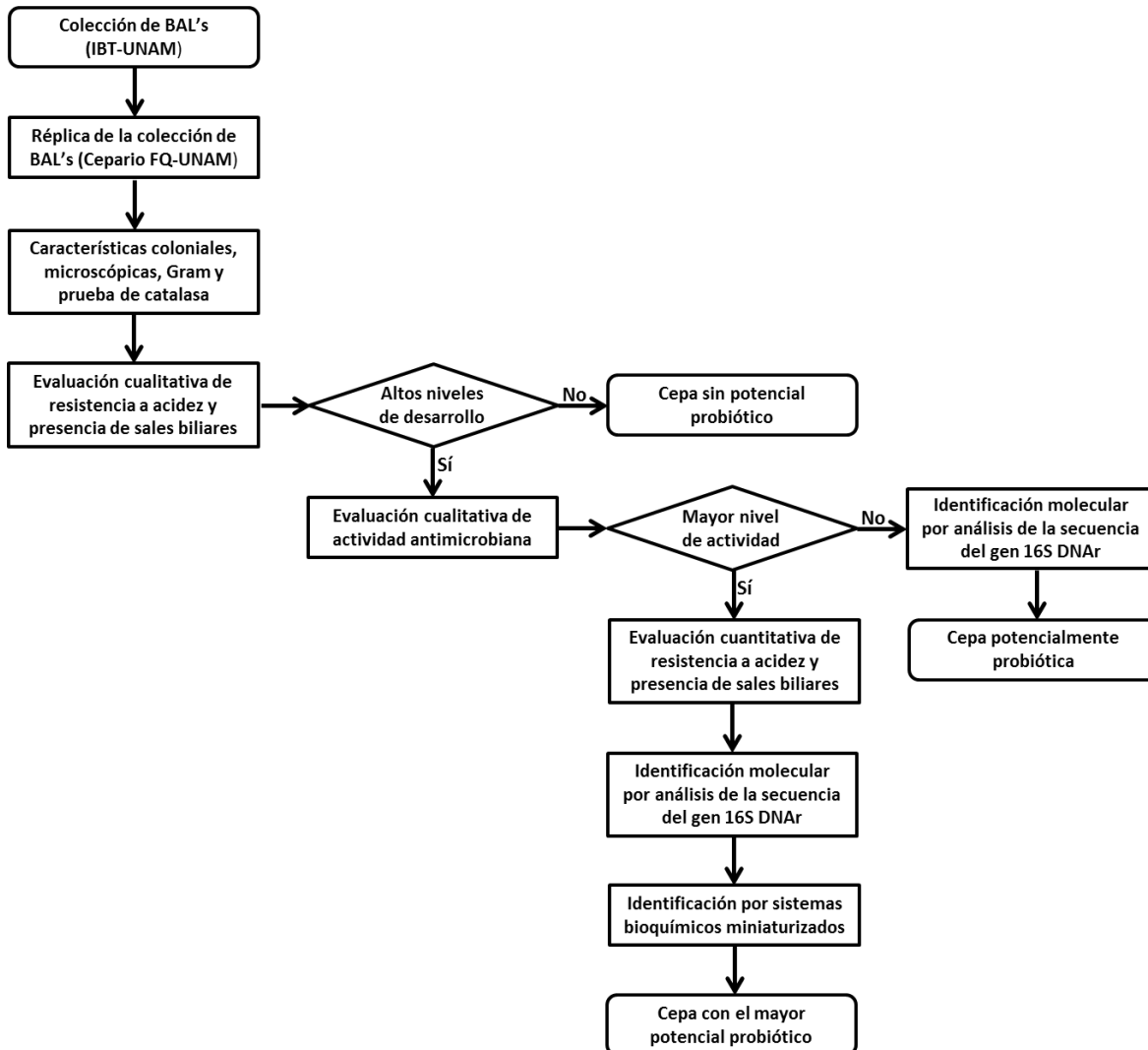


Figura 5. Esquema de trabajo.

1. Reactivación y conservación de cepas.

Se trabajó con una colección de cepas de bacterias lácticas aisladas de pulque elaborado en la región de la Mixteca Oaxaqueña, preservadas en caldo De Man Rogosa Sharpe (MRS) + glicerol 50 % a ultracongelación a -70 °C. Esta colección

de bacterias lácticas fue almacenada en el Instituto de Biotecnología (IBT) de la UNAM, y se hizo una réplica de la misma para este proyecto, la cual se almacenó en el cepario de la Facultad de Química (FQ) de la UNAM. Con el fin de contar con cepas de referencia se efectuó la conservación de las cepas probióticas comerciales *Lactobacillus casei* Shirota y *L. casei* aislado de la bebida láctea fermentada “Lalacult” (*L. casei* Lalacult®). La identidad de esta última cepa fue determinada mediante secuenciación del gen 16S ADNr en un estudio anterior (Cervantes, 2010).

Para su conservación en subcultivo y ultracongelación, todas las cepas de la colección se reactivaron en agar MRS (Difco) a 37 °C durante 48 h en condiciones de microaerofilia.

1.1. Conservación a mediano plazo

Se inoculó cada cepa reactivada de la colección en caldo MRS (Difco) a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia (incubación del medio dentro de un frasco de vidrio con un cabo de vela encendida), y posteriormente se inocularon por picadura en medio semisólido MRS + 0.5 % de agar bacteriológico y una punta de espátula de carbonato de calcio para neutralizar la acidez del medio.

1.2. Conservación a largo plazo.

Así mismo, de la cepa reactivada se colocaron 0.5 mL en un microtubo de centrifuga con 0.5 mL de glicerol al 50 %, se homogeneizaron y se congelaron a -70 °C.

1.3. Reactivación de cepas.

Para efectuar los distintos experimentos, cada cepa conservada en medio semisólido y/o en congelación se reinoculó en un tubo de caldo MRS y se incubó a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. Posteriormente se reinocularon 0.5 mL en el

mismo medio y se incubaron nuevamente bajo las mismas condiciones. Ésto se efectuó con el propósito de contar con células perfectamente viables.

2. Morfología colonial y microscópica, Gram y prueba de la catalasa.

De las cepas reactivadas en agar MRS (Inciso 1.3) se registró su morfología colonial y microscópica, se efectuó una tinción de Gram y se llevó a cabo la prueba de la catalasa, colocando una colonia en un portaobjetos y agregándole una gota de peróxido de hidrógeno. La formación de burbujas brinda un resultado positivo, ya que indica la presencia de la enzima catalasa, capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.

3. Evaluación cualitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares

Cada cepa reactivada fue sembrada en caldo MRS con 0.3 % p/v de sales biliares (OXOID) y pH 3.50 e incubada a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. Se evaluó cualitativamente el grado de desarrollo de las cepas en el medio, al comparar entre los tubos con la cepa la turbidez desarrollada, calificándose en desarrollo nulo (-), desarrollo escaso (+), desarrollo medio (++) y desarrollo abundante (+++). Aquellas cepas con desarrollo medio y abundante se consideraron más resistentes a acidez y sales biliares.

Para corroborar que cada cepa que sobrevivió a la exposición a condiciones de acidez y presencia de sales biliares aún se encontraba viable, se depositaron 20 µL del medio con cepa en agar MRS y se incubó en condiciones de microaerofilia a 37°C durante 24 h. El nivel de desarrollo de éstas fue evaluado de la misma manera que en el caso de los tubos y se corroboró el Gram y morfología microscópica.

4. Evaluación de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos.

4.1. Recuperación y preparación de BAL's.

Se recuperaron las cepas seleccionadas del ensayo anterior (Inciso 1.3) en caldo APT. Posteriormente, cada cepa fue estriada en un área de 1 cm² en agar APT, en cajas divididas en cuadrantes con dicha área marcada. Se transfirieron 3 cepas distintas por caja y se efectuó un cuarto estriado de agua destilada estéril como control negativo. Cada cepa fue inoculada por duplicado. Se incubaron los medios a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. El mismo procedimiento se llevó a cabo con las cepas probióticas comerciales.

4.2. Acondicionamiento de bacterias patógenas

Para determinar la actividad antimicrobiana de las BAL's en estudio se emplearon los siguientes microorganismos patógenos: *Salmonella enterica enterica* serovar. Typhi (S. Typhi) ATCC 9992, *S. enterica enterica* serovar. Enteritidis (S. Enteritidis), *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* No 01 y *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) 2348/69. Se efectuó su conservación en subcultivo en agar cistina triptéina (CTA; Difco) y, a partir de éstos, se llevó a cabo su recuperación en agar Luria (Difco) (*S. enterica enterica* serovar. Typhi, *S. enterica enterica* serovar. Enteritidis y EPEC), o en agar infusión cerebro corazón (BHI; Difco) (*L. monocytogenes* y *V. cholerae*), incubándose a 37°C durante 24 horas. Con el fin de contar con células viables, a partir de colonias inicialmente recuperadas, se efectuó una segunda recuperación con el fin de asegurar la viabilidad de cada una.

4.3. Preparación de medio con el microorganismo patógeno.

A partir del microorganismo reactivado (inciso 4.2) se tomaron varias colonias y se depositaron en un tubo con 4.5 mL de solución salina isotónica (SSI), hasta alcanzar una D.O.=0.2, equivalente en la escala de Mc Farland a 0.9 empleando el

equipo Densimat. De cada tubo se tomaron 0.8 mL y se depositaron en un tubo con 8 mL de agar suave (caldo luria o caldo BHI, con agar bacteriológico al 0.3%), previamente fundido y enfriado hasta temperatura de antebrazo (42°C, aproximadamente). El tubo fue homogeneizado con vortex, durante 15 s a velocidad media.

4.4. Ensayo de actividad antimicrobiana

Se virtió la mezcla de agar suave con la cepa patógena (inciso 4.3) en la caja de agar APT con las BAL's previamente desarrolladas (inciso 1.3). Una vez solidificado el agar suave se incubó a 37 °C durante 24 h en condiciones de microaerofilia. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó cualitativamente la actividad antimicrobiana de las BAL's, comparando los diámetros de los halos de inhibición y calificándola en nula (-), baja (+), media (++) , alta (+++) y la mayor actividad antimicrobiana (++++) en cada ensayo.

5. Determinación de la concentración celular de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares

Aquella cepa que mostró la mayor actividad antimicrobiana fue seleccionada para determinar su concentración celular posterior al ensayo de resistencia a acidez y sales biliares. Se partió de las cepas de BAL's reactivadas (inciso 1.3) y también de las cepas sometidas a pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares (inciso 3). Para cada una de ellas se realizaron diluciones decimales seriadas hasta 10^{-7} . Se depositó 0.1 mL de cada dilución en agar APT, se realizó la extensión superficial con perlas de vidrio y se procedió a incubar el medio a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. Las diluciones y la inoculación en placa se realizaron por duplicado. Se contabilizaron las cajas estadísticamente representativas (30-300 colonias) y se calcularon las unidades formadoras de colonias para cada caso.

6. Identificación molecular de BAL's mediante el análisis de la secuencia del gen rDNA 16S

De la colección de cepas de BAL's depositadas en el IBT se efectuó la identificación molecular de la secuencia del gen 16S rDNA de algunas de ellas, por lo que la metodología descrita a continuación se llevó a cabo para aquellas cepas resistentes a acidez y presencia de sales biliares sin identificar molecularmente.

6.1. Extracción de DNA cromosomal

Se recuperaron las BAL's como se describió previamente, estriando por agotamiento cada cepa en agar APT y se incubaron a 37 °C durante 24 h en microaerofilia. A continuación se prepararon las suspensiones para la extracción del DNA cromosomal, dispersando el desarrollo colonial en placa en 2 mL de caldo APT hasta la obtención de un cultivo saturado. Cada suspensión fue transferida a un tubo de microcentrífuga estéril. La extracción de DNA cromosomal se llevó a cabo con el UltraClean™ microbial DNA isolation kit (Mo Bio), siguiendo las instrucciones del fabricante.

6.2. Electroforesis en gel de agarosa

Con el fin de evaluar la extracción y su integridad, el DNA extraído se analizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en solución amortiguadora Tris-Borato-EDTA (TBE) (TRIS base 0.89 mM pH 8.0, 89 mM de ácido bórico, 2 mM de EDTA), el cual se corrió a un voltaje de 90 V. De cada muestra se cargaron 5 µL, y se empleó como referencia el marcador de peso molecular O'Generule™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific). El gel fue visualizado en un equipo UV Transiluminator 2000 (Bio-Rad), con ayuda de un cono-cámara (Bio-Rad) y un filtro tipo 667 #15 amarillo profundo (Polaroid). El revelador de bandas empleado fue bromuro de etidio al 0.04 %, el cual fue incorporado en el gel durante su preparación.

6.3. Amplificación del rDNA 16S por PCR

El DNA extraído fue utilizado como molde para la amplificación del gen rDNA 16S por PCR. La mezcla de reacción empleada fue la siguiente:

Buffer 10X	5.00 µL
Mg ₂ Cl (25 mM)	5.00 µL
dNTP's (dATP, dTTP, dGTP y dCTP, 0.2 mM de cada uno)	1.00 µL
Primer forward fD1 ¹ 1.0 µM	0.60 µL
Primer reverse rD1 ¹ 1.0 µM	0.60 µL
Taq DNA Polimerasa recombinante (Thermo Scientific) (1 U/ µL)	1.25 µL
DNA molde	1.00 µL
Agua mili Q	35.55 µL
Volumen final de reacción	50.00 µL

1: Weisburg *et al.*, 1991

El par de primers empleados fueron los descritos por Weisburg *et al.* (1991), los cuales permiten la obtención de un amplicón de 1.5 Kb.

fD1: 5'-CCGAATTCGTCGACAACAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

rD1: 5'-CCCGGGATCCAAGCTTAAGGAGGTGATCCAGCC-3'

La mezcla de reacción anterior fue colocada en un tubo para PCR de 200 µL. La reacción de amplificación fue ejecutada en un termociclador My Cycler™ (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones:

- Un ciclo de desnaturalización inicial: 95 °C/ 5 minutos.
- 30 ciclos de amplificación: 95 °C/1 minuto (desnaturalización).
49.9 °C/ 1 minuto (alineamiento).
72 °C/ 1.5 minutos (amplificación).

- Un ciclo de extensión final: 72 °C/ 5 minutos.
- Almacenamiento: 4 °C

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (inciso 6.2) para evaluar el tamaño del amplicón esperado. Posteriormente fueron purificados con el kit Pure Link™ (Invitrogen), con el fin de eliminar productos de bajo peso molecular (dímeros de primers), residuos de sales y la enzima de la amplificación. El producto purificado fue analizado por electroforesis (inciso 6.2).

6.4. Secuenciación e identificación.

Los productos de PCR purificados fueron enviados a la Unidad de Secuenciación de DNA del IBT-UNAM, con el propósito de efectuar su secuenciación e identificar a las cepas en estudio. Por cada reacción de amplificación, se depositaron en un tubo de microfuga de 200 µL, 14 µL del producto de PCR purificado junto con 1 µL del primer para secuenciación (primer fD1 o rD1 en función de la reacción, a concentración de 1.0 µM) y se aforó a un volumen de 16 µL con agua grado biología molecular.

Una vez que se contó con las secuencia, se visualizaron en el programa Finch TV (Finch TV, versión 1.4.0, Geospiza Inc.) para evaluar la calidad de secuencia. De cada una de ellas se obtuvo su identidad mediante el programa online Blastn, utilizando el algoritmo Megablast, de la página del National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Con la secuencia fw y rv se obtuvo la secuencia consenso del gen ribosomal 16S. La identidad de cada una de ellas se obtuvo como se describió previamente.

A continuación se obtuvo el árbol filogenético. Se efectuó el alineamiento de las secuencias obtenidas con el programa Mega 6.0 (Tamura, Stecher, Peterson y Kumar, 2013), empleando la herramienta de alineamiento múltiple Clustal W. El archivo de las secuencias alineadas se empleó para obtener el árbol filogenético correspondiente. Se empleó la prueba de filogenia Bootstrap con mil réplicas, el

método de agrupamiento Neighbor-Joining y el método de sustitución de nucleótidos de Jukes-Cantor. Como grupo externo se empleó la secuencia de 16S DNAr de *Sulfolobus acidocaldarius* ATCC33909 (NR_043400.1), en tanto que las secuencias del mismo gen para *L. brevis* cepas 12-2 (EU744192.1), DCY 65-1 (KM507722.1) y KLDS 1.0721 (EU626006.1); *L. casei* cepas Shirota (Gutierrez, 2015), T2 (KP165840.1), T20 (KP165839.1), LvK2 (KM350168.1), LvK1 (KM350167.1), LC1 (KM350163.1) y R465 (AB921225.1); *L. paracasei* cepas WVS270 (KM257681.1), S6 (KP216392.1), T16 (KP165842.1), TD3 (KP165841.1) y T3 (KP165843.1); *L. paracasei* subsp. *paracasei* cepa Floraactive 19058-4 (HE983621.1); *L. plantarum* cepas KLB 416 (KM670024.1), BM4 (KP976095.1), KLB 411 (KM670023.1), LCG3 (KJ806299.1), I2 (KJ806294.1), L2 (KJ806293.1) y PON 100491 (KJ921833.1); *L. plantarum* subsp. *Plantarum* cepas A1 (AB813055.1) y ZZU 23 (AB830324.1); *L. mesenteroides* KIBGE-IB22M (JQ658346.1) y *S. epidermidis* cepas GKY 8/1B (KC481591.1), KS3H17 (KJ571204.1) y MB2M14 (KP196810.1) se emplearon como secuencias de referencia

7. Identificación de BAL's por el sistema bioquímico miniaturizado API 50 CH[®] de BioMérieux[™]

Se identificó con el sistema API 50 CH[®] de BioMérieux[™] a la cepa seleccionada de las pruebas *in vitro* con el mejor potencial probiótico y a la cepa de *L. casei* Shirota como referencia. De las cepas recuperadas 24 h en MRSA se tomaron varias colonias y se depositaron en un tubo con SSI estéril para obtener una solución con una alta concentración de la cepa. A partir de este tubo se tomaron 70 gotas con una pipeta Pasteur y se depositaron en otro tubo con SSI estéril, hasta alcanzar una turbidez de 2.0 en la escala de M^cFarland. De este segundo tubo se transfirieron 140 gotas a un tubo con 50 mL de medio API 50 CHL, del cual se depositaron 300 µL aprox. en cada una de las celdas de reacción. Esta tira fue incubada a 37°C, y el registro de los resultados se efectuó a las 24 y 48 h de

incubación, registrando un resultado positivo ante el cambio de color (de amarillo a azul) del medio en la celda. Una vez que se contó con el perfil bioquímico se procedió a obtener la identidad de las cepas en cuestión empleando la base de datos de API Lab Plus Biomérieux V 3.3.3[®]. En el anexo 2 se indican las pruebas bioquímicas de las que consta este sistema.

Resultados y discusión

1. Recuperación de la colección

Se realizó la réplica de la colección de bacterias lácticas del pulque, aisladas de ranchos productores de la Mixteca Oaxaqueña, a partir de la colección original depositada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Algunas de estas cepas fueron previamente identificadas dentro del grupo de trabajo mediante tipificación por ARDRA y secuenciación de los perfiles únicos de bandeo (datos no mostrados). La réplica de la colección original contó con un total de 146 cepas. De todas las cepas reactivadas no fue posible recuperar 13 (B1d', B2a'', B41', B7c, B8c, B8c', B8f, B9i, B10b, B10c', B13c, B14c, B14e'), por lo cual se conservaron 133 cepas. Estas cepas fueron conservadas en ultracongelación a -70 °C y en subcultivo con la metodología ya descrita (Inciso 1). El nivel de recuperación de las cepas se empleó como criterio de conservación, el cual fue bueno para las cepas conservadas al momento de uso (6 meses, aproximadamente).

2. Características morfológicas, microscópicas y prueba de la catalasa.

Se observaron cinco tipos distintos de colonias para las cepas de la colección:

- Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas (63 cepas, 48 % de la colección);
- Colonias puntiformes, blancas y opacas (7 cepas, 5 % de la colección);
- Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso (35 cepas, 26 % de la colección);
- Colonias redondas chicas, blancas, opacas y con borde liso (9 cepas, 7 % de la colección);
- Colonias redondas, medianas, blancas, brillantes y con borde liso (19 cepas, 14 % de la colección).

Microscópicamente las morfologías presentes fueron diplococos (56 cepas, 42 % de la colección), cocos (principalmente estafilococos) (29 cepas, 22% de la colección), bacilos cortos (41 cepas, 31 % de la colección) y bacilos largos (7 cepas, 5 % de la colección). En lo que respecta al Gram todas las cepas fueron Gram-positivas (figura 6).

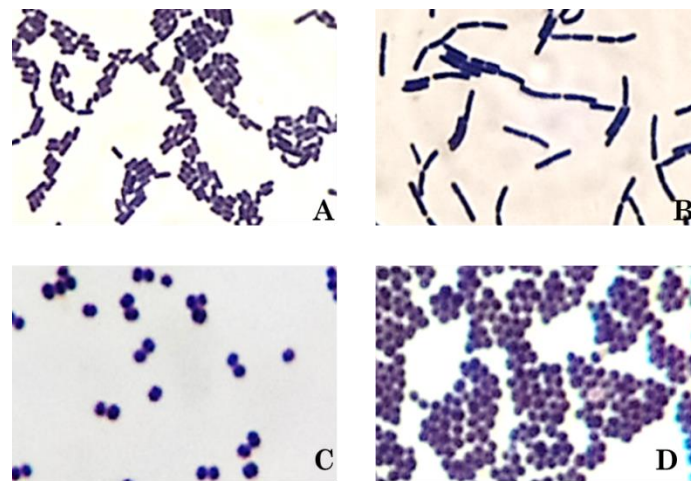


Figura 6. Morfologías y Gram observados. A - Bacilos cortos, B - Bacilos largos, C – Diplococos y D – Cocos (estafilococos). Todas las cepas fueron Gram positivo

Para la prueba de la catalasa, únicamente 16 cepas (12 % de la colección) fueron identificadas como catalasa-positivas, por lo cual 117 cepas (88 % de la colección) podrían pertenecer al grupo de las bacterias lácticas (Klein *et al.*, 1998). De estas cepas con actividad de enzima catalasa 12 correspondieron a estafilococos y 4 a bacilos. Por el análisis de ARDRA previamente realizada se identificaron 4 de estas cepas: una como *Staphylococcus hominis* ssp. *novobiosepticus* (cepa B6h), dos como *Staphylococcus* sp. (cepas B9e y B11f) y 1 como *Bacillus amyloliquefaciens* (cepa B8a); el resto de las cepas pueden tratarse de microorganismos de los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus*. De éstas cepas se utilizó la cepa B14c como control para las evaluaciones posteriores. En el caso de las cepas probióticas comerciales ambas presentaron colonias puntiformes, chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso y definido; para la prueba de

la catalasa se observó un resultado negativo. *L. casei* Shirota presentó una morfología microscópica de bacilos cortos Gram-positivos, en tanto que *L. casei* aislada de Lalacult[®] presentó una morfología microscópica de estreptobacilos cortos Gram-positivos. En el Anexo 1 se presentan las características para cada una de las cepas.

3. Evaluación cualitativa de resistencia a acidez y presencia de sales biliares.

La exposición a las condiciones experimentales de acidez (pH 3.5) y presencia de sales biliares (0.3 %) tuvo como objetivo simular el efecto antimicrobiano de la acidez en el estómago y la secreción de sales biliares en el duodeno. En el ambiente estomacal el pH suele encontrarse en valores de 2.5 a 3.5, logrando descender hasta 1.5 en períodos de ayuno y ascender hasta 6 tras la ingesta de alimentos (Masco *et al.*, 2007); en tanto que en el ambiente intestinal se presenta una segunda barrera, las sales biliares, en una concentración aproximada de 0.35 % (De Castro y Pérez, 2006). Por otra parte, al inocular la cepa en agar MRS sin acidez ni sales biliares después de la exposición a estas condiciones se simula el desarrollo de la cepa en la mucosa intestinal con el fin de colonizarla, además de determinar su nivel de recuperación posterior a la exposición a ambas condiciones. Este tipo de ensayos constituyen una de las pruebas que deben efectuarse con bacterias potencialmente probióticas para colonizar el tracto gastrointestinal, ya que la resistencia a ambas barreras es indispensable para mantener su viabilidad al llegar a la mucosa intestinal.

De las 133 cepas sembradas, 109 cepas presentaron algún nivel de desarrollo en el medio con alta acidez y sales biliares (figura 7). Los resultados de esta evaluación para las cepas de la colección fueron los siguientes:

- a) 33 cepas se desarrollaron abundantemente (+++) en el medio con pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares. Al evaluar su recuperación en agar MRS 9 presentaron un alto nivel de desarrollo (++), 5 un nivel escaso (+) y 19 no presentaron viabilidad (-).
- b) 39 cepas mostraron un desarrollo medio (++) en el medio con pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares. Al recuperarse en agar MRS 6 presentaron un alto nivel de desarrollo (++), 5 un desarrollo escaso (+) y 28 no presentaron viabilidad (-).
- c) De las 38 cepas que mostraron un desarrollo escaso (+) en el medio con pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares. Durante la recuperación en agar MRS 2 mostraron un desarrollo posterior alto (++), 2 un desarrollo posterior bajo (+) y las 34 restantes no presentaron viabilidad (-).
- d) 6 cepas, a pesar de haber mostrado una turbidez similar a la del medio con pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares sin inocular. Al reinocular mostraron un desarrollo escaso (+). En este caso puede argumentarse que estas cepas son capaces de resistir las condiciones de acidez y presencia de sales biliares, aunque su desarrollo haya sido muy bajo en este medio.
- e) Por último 17 cepas no mostraron desarrollo alguno bajo condiciones de alta acidez y presencia de sales biliares ni viabilidad posterior al haberse inoculado en MRSA. Las cepas probióticas comerciales también mostraron estos niveles de desarrollo.

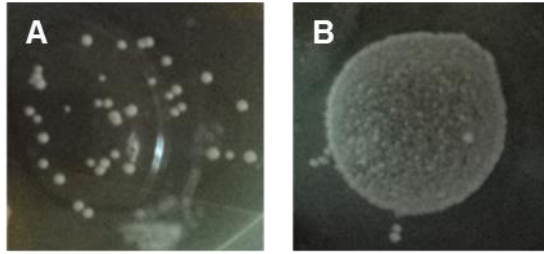


Figura 7. Niveles de desarrollo para BAL's en agar MRS, posteriores a la exposición a pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares. A-Desarrollo escaso; B-Desarrollo abundante.

De esta evaluación se seleccionaron 15 cepas, las cuales presentaron los mejores niveles de desarrollo en las dos etapas de la evaluación. Sus características se especifican en la tabla 11, en la cual las cepas con los mejores resultados aparecen sombreadas.

Tabla 11. Cepas resistentes seleccionadas

Cepa	Características microscópicas	Catalasa	Desarrollo en el medio (caldo MRS con pH 3.5 y 0.3% sales biliares)	Desarrollo posterior a la exposición a acidez y sales biliares (agar MRS)
B1c'	Estreptobacilos largos Gram (+)	Negativo	++	++
B2b	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B2b'	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B3b'	Estreptobacilos largos Gram (+)	Negativo	+++	++
B3d'	Estreptobacilos largos Gram (+)	Negativo	+++	++
B6f	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B6g''	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B6h''	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B8e	Bacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B8e'	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	++	++
B9d''	Estreptobacilos largos Gram (+)	Negativo	++	++
B9j'	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	+++	++
B13c'	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	++	++
B14c	Estafilococos Gram (+)	Positivo	++	++
C	Bacilos cortos Gram (+)	Negativo	++	++
L. casei Lalacult®	Estreptobacilos cortos Gram (+)	Negativo	-	-
L. casei Shiota	Bacilos cortos Gram (+)	Negativo	-	-

En el medio de cultivo empleado el pH y la presencia de sales biliares representan barreras importantes para el desarrollo de las bacterias lácticas. Su rango de pH óptimo de desarrollo se encuentra entre 5.0 y 6.0, aunque se han reportado valores entre 3.7 y 4.3 de sobrevivencia para lactobacilos; para valores de pH 2.0 se ha observado una importante reducción en la viabilidad (Tripathi y Giri, 2014), aunque para *Lactobacillus casei* Zhang se reportó un importante porcentaje de sobrevivencia a pH 2.5 (Wu *et al.*, 2011). Los mecanismos involucrados en la sobrevivencia a tales condiciones involucran mantener la integridad de membrana y amortiguar el medio mediante distintas descarboxilaciones y desaminaciones (Begley, Gahan y Hill, 2005; Teixeira *et al.*, 2014). Se ha observado que la capacidad de resistencia a la presencia de sales biliares en bacterias Gram-positivas, que presentan una mayor sensibilidad a este componente, está dada por la presencia de la enzima hidrolasa de sales biliares (BSH), capaz de romper el enlace de la taurina o glicina con las sales biliares, perdiendo su capacidad de unirse a la membrana celular y, consecuentemente, perdiendo su actividad antimicrobiana (Begley, Gahan y Hill, 2004). Algunas de las cepas reportadas con actividad de BSH son *L. plantarum* WCFS1, *L. johnsonii* NCC 533, *L. johnsonii* 100-100, *L. acidophilus* KS-13 (De Vos *et al.*, 2012), *L. acidophilus* NCFM ATTC700396, *L. brevis* ATCC 367 y *L. gasseri* ATCC 33323 (Begley, Hill y Gahan, 2006). Debido a que los genes que codifican para esta enzima suelen transmitirse horizontalmente, es más probable que dicha actividad se encuentre en cepas con mayor relación con el ambiente intestinal por lo que es posible que en las cepas de este estudio haya otros mecanismos involucrados, tales como transportadores multidrogas (Begley, Gahan y Hill, 2006; Von Wright y Axelsson, 2012). La capacidad de sobrevivencia a estas condiciones es dependiente de la cepa, ya que se ha observado la viabilidad de distintas cepas de *L. rhamnosus* aisladas de queso Parmesano tras 168 h de incubación posterior al estrés en MRS (Succi *et al.*, 2005). En este trabajo, para el caso de las cepas de referencia, a pesar de no haber observado desarrollo en este medio, estudios anteriores han comprobado la

viabilidad de esta cepa *in vitro* (Campos, 2010) e *in vivo* (Yuki *et al.*, 1999). La diferencia observada en la sobrevivencia de ambas cepas pudo deberse a la exposición simultánea a ambas barreras, ya que en otros estudios la exposición se efectúa en dos etapas, y en tiempos menores de exposición (Monteagudo *et al.*, 2012; Senaka *et al.*, 2012; García-Ruiz *et al.*, 2014).

De las 133 cepas de la colección se seleccionaron 15, ya que presentaron los mejores niveles de desarrollo en el medio con pH 3.5 y 0.3% de sales biliares y los mejores niveles de recuperación tras dicha exposición. De estas cepas 14 correspondieron a bacilos Gram-positivos, entre las cuales 5 (B1c', B8e', B9d'', B13c' y C) mostraron niveles de desarrollo medio en caldo MRS con pH 3.5 y 0.3% de sales biliares, mientras que las 9 restantes (B2b, B2b', B3b', B3d', B6f, B6g'', B6h'', B8e y B9j'') presentaron un nivel de desarrollo alto en las mismas condiciones; al ser reinoculadas en agar MRS, estas 14 cepas desarrollaron abundantemente. Además se seleccionó una cepa de estafilococos como cepa control (B14c), cuyo nivel de desarrollo en caldo MRS con pH 3.5 y 0.3% de sales biliares fue medio, en tanto que al recuperarse en agar MRS desarrolló abundantemente. Puede suponerse que las cepas seleccionadas cuentan con mecanismos más eficientes para sobrevivir ante estas condiciones, lo que puede repercutir en una mejor capacidad de llegar viables al intestino humano.

4. Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana contra microorganismos patógenos

Las 15 cepas seleccionadas fueron evaluadas cualitativamente en cuanto a su actividad antimicrobiana contra los siguientes microorganismos patógenos: *S. Typhi*, *S. Enteritidis*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae* No 01 y EPEC, ya que estos son algunos de los microorganismos patógenos responsables de las enfermedades transmitidas por alimentos. Esto se efectuó al inocular las cepas de BAL's en agar APT, cada una en un área de 1 cm², y una vez desarrolladas depositando encima una mezcla de agar Luria o BHI con el patógeno, para

observar posteriormente el desarrollo de un halo de inhibición en la periferia del área de crecimiento de la BAL. Los resultados de inhibición contra cada uno de los patógenos se despliegan a continuación (figuras 8 a 12 y tabla 12).

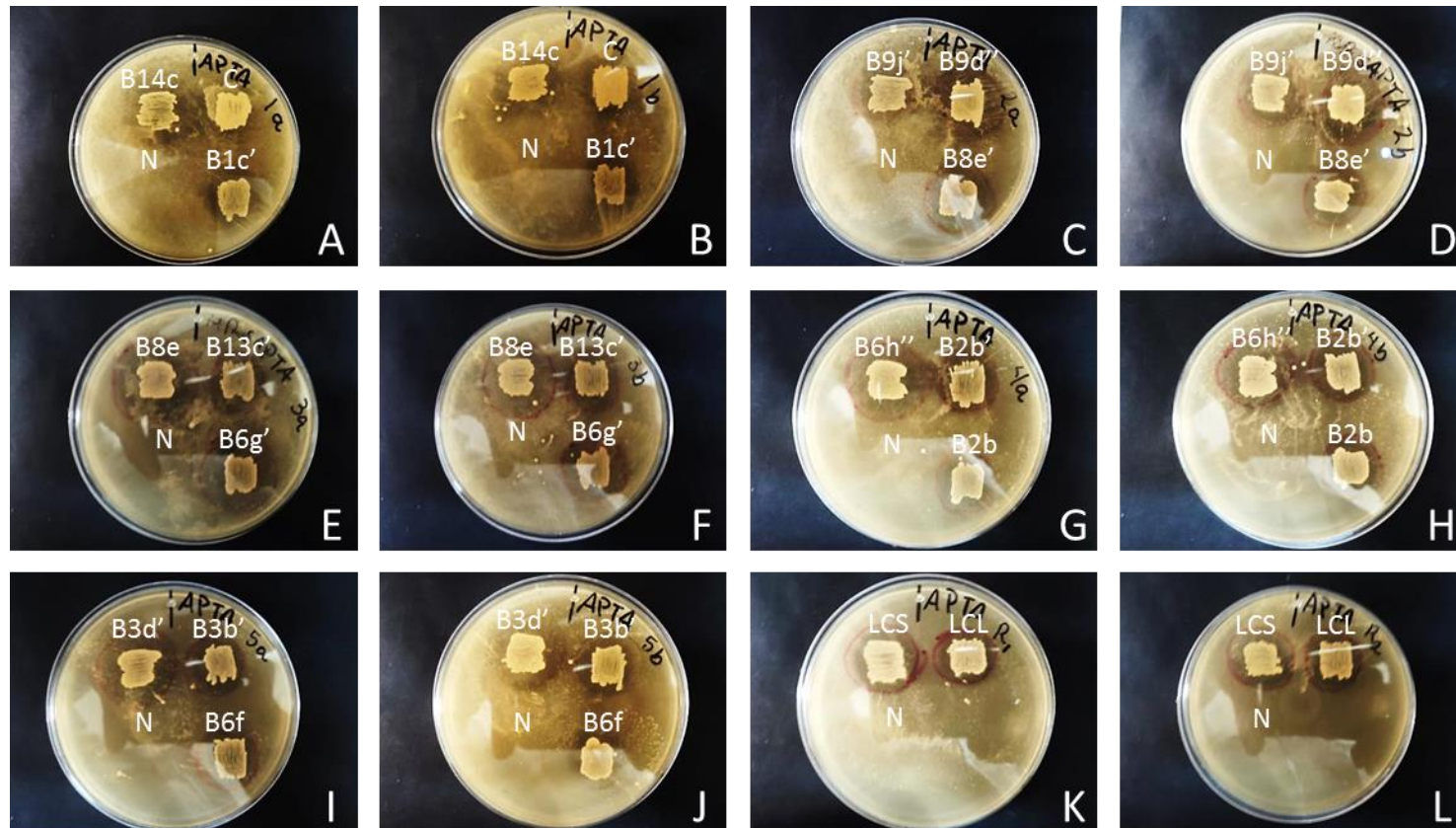


Figura 8. Halos de inhibición de las BAL's contra *S. Typhi*. BAL's inoculadas en agar APT con sobrecapa de agar Luria y *S. Typhi*, incubadas a 37 °C/24 h. A y B: duplicados para B14c, C y B1c'; C y D: duplicados para B9j', B9d'' y B8e'; E y F: duplicados para B8e, B13c' y B6g'; G y H: duplicados para B6h'', B2b' y B2b; I y J: duplicados para B3d', B3b' y B6f; K y L: duplicados para *L. casei* Shirota (LCS) y *L. casei* Lalacult® (LCL). Control negativo: agua destilada estéril (N)

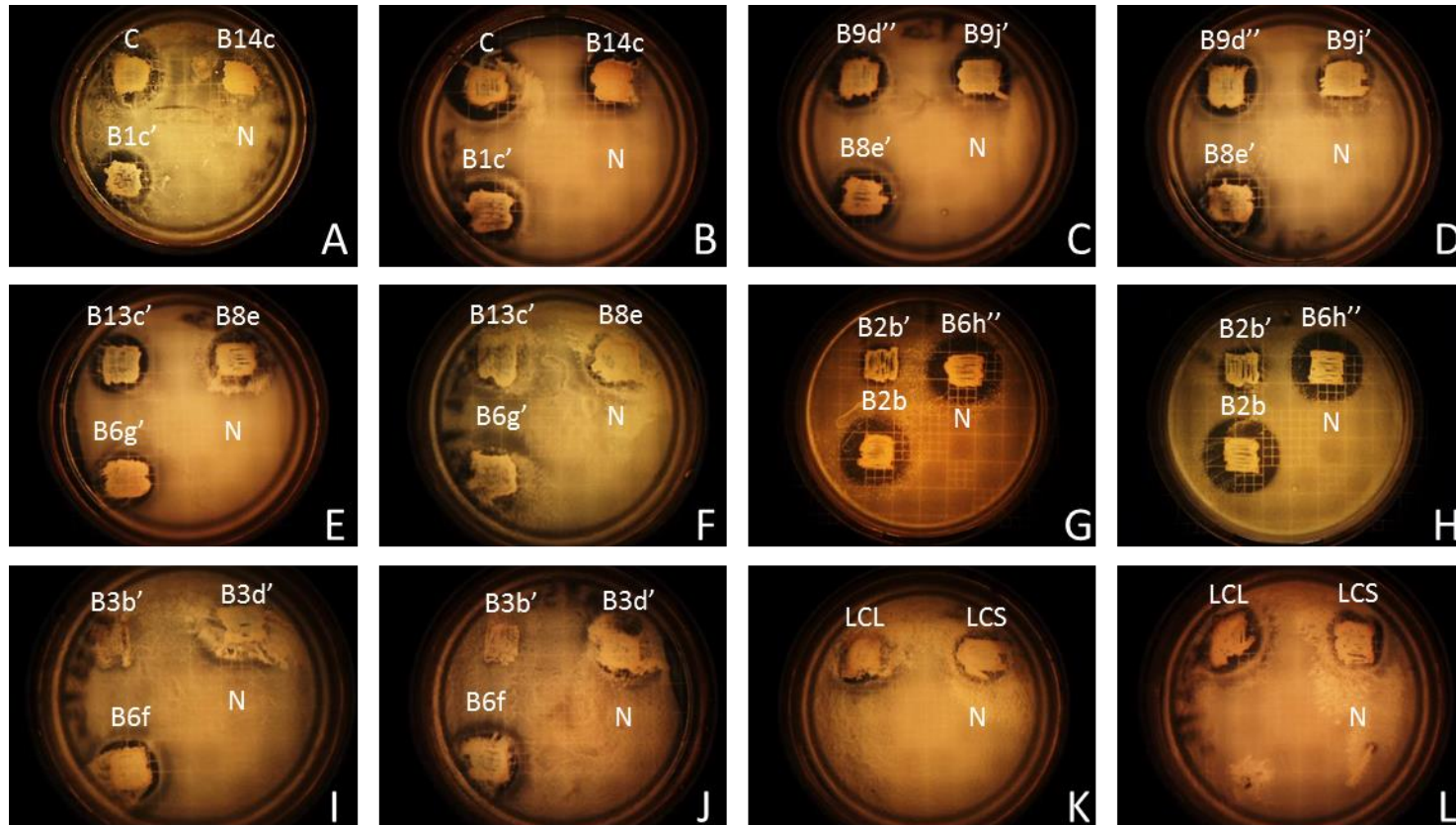


Figura 9. Halos de inhibición de las BAL's contra *S. Enteritidis*. BAL's inoculadas en agar APT con sobrecapa de agar Luria y *S. Enteritidis*, incubadas a 37 °C/24 h. A y B: duplicados para B14c, C y B1c'; C y D: duplicados para B9j', B9d'' y B8e'; E y F: duplicados para B8e, B13c' y B6g'; G y H: duplicados para B6h'', B2b' y B2b; I y J: duplicados para B3d', B3b' y B6f; K y L: duplicados para *L. casei* Shirota (LCS) y *L. casei* Lalacult® (LCL). Control negativo: agua destilada estéril (N)

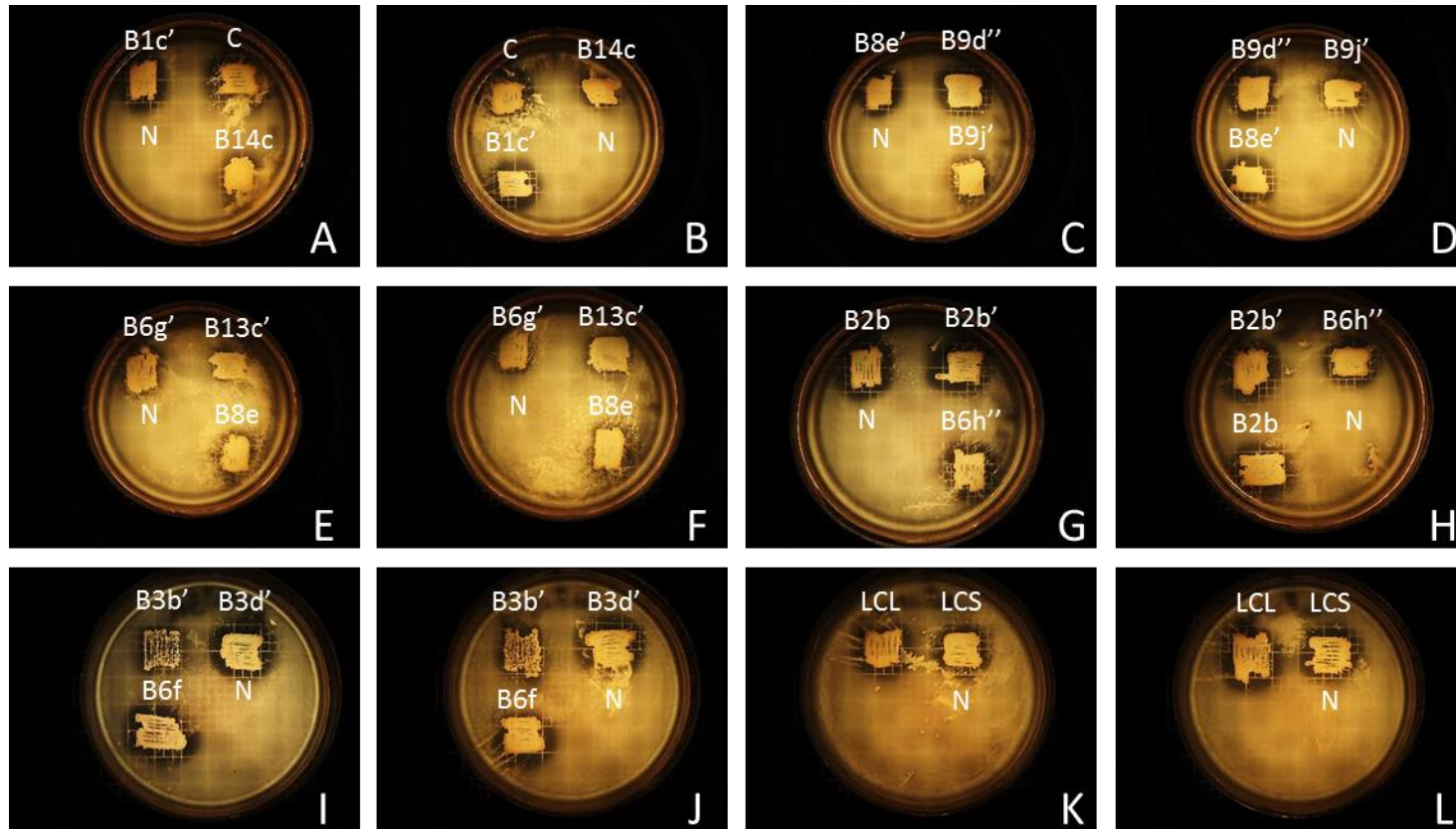


Figura 10. Halos de inhibición de las BAL's contra *L. monocytogenes*. BAL's inoculadas en agar APT con sobrecapa de agar BHI y *L. monocytogenes*, incubadas a 37 °C/24 h. A y B: duplicados para B14c, C y B1c'; C y D: duplicados para B9j', B9d'' y B8e'; E y F: duplicados para B8e, B13c' y B6g'; G y H: duplicados para B6h'', B2b' y B2b; I y J: duplicados para B3d', B3b' y B6f; K y L: duplicados para *L. casei* Shirota (LCS) y *L. casei* Lalacult® (LCL). Control negativo: agua destilada estéril (N)

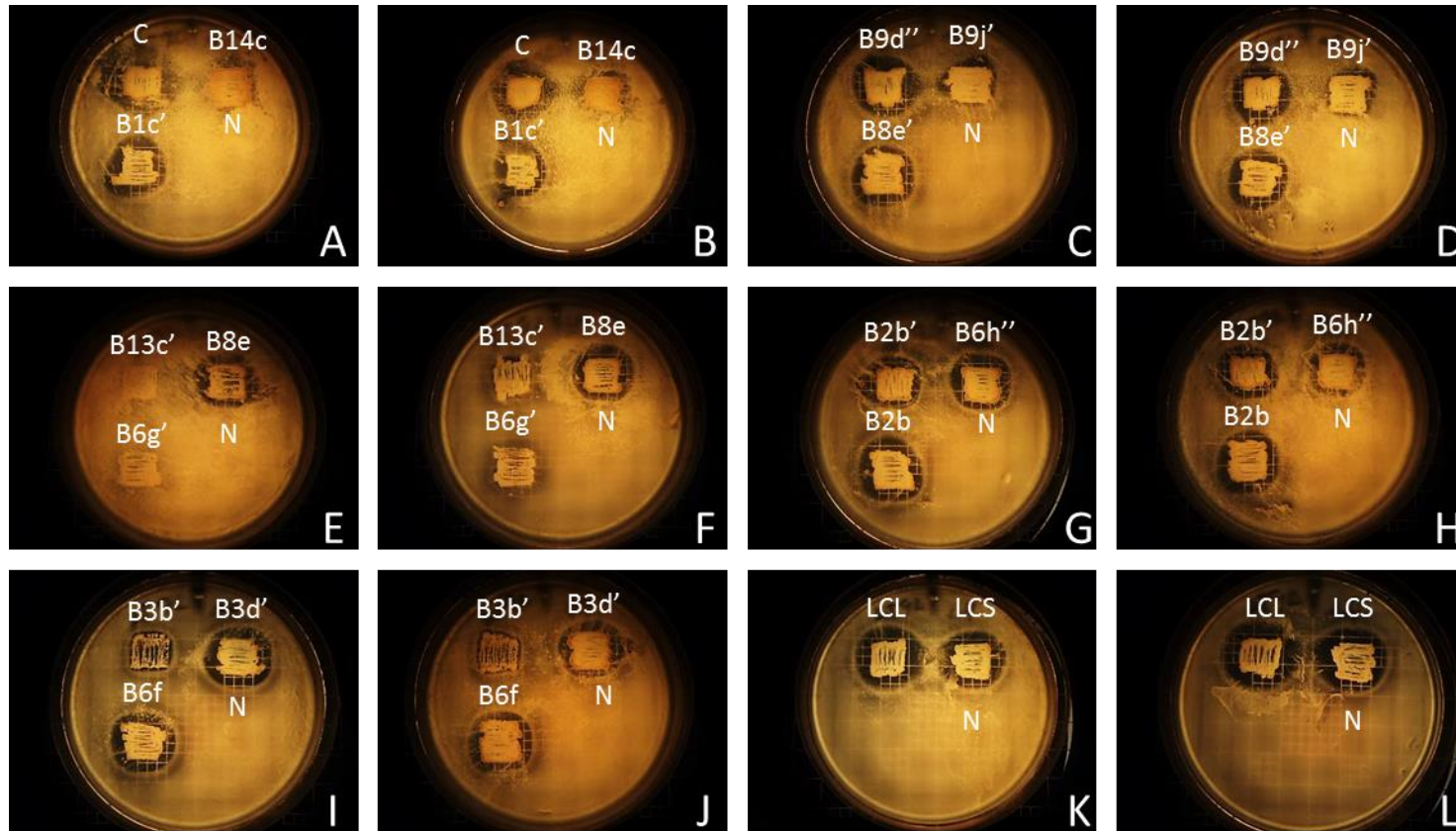


Figura 11. Halos de inhibición de las BAL's contra *V. cholerae* No 01. BAL's inoculadas en agar APT con sobrecapa de agar BHI y *V. cholerae* No 01, incubadas a 37 °C/24 h. A y B: duplicados para B14c, C y B1c'; C y D: duplicados para B9j', B9d'' y B8e'; E y F: duplicados para B8e, B13c' y B6g'; G y H: duplicados para B6h'', B2b' y B2b; I y J: duplicados para B3d', B3b' y B6f; K y L: duplicados para *L. casei* Shirota (LCS) y *L. casei* Lalacult® (LCL). Control negativo: agua destilada estéril (N)

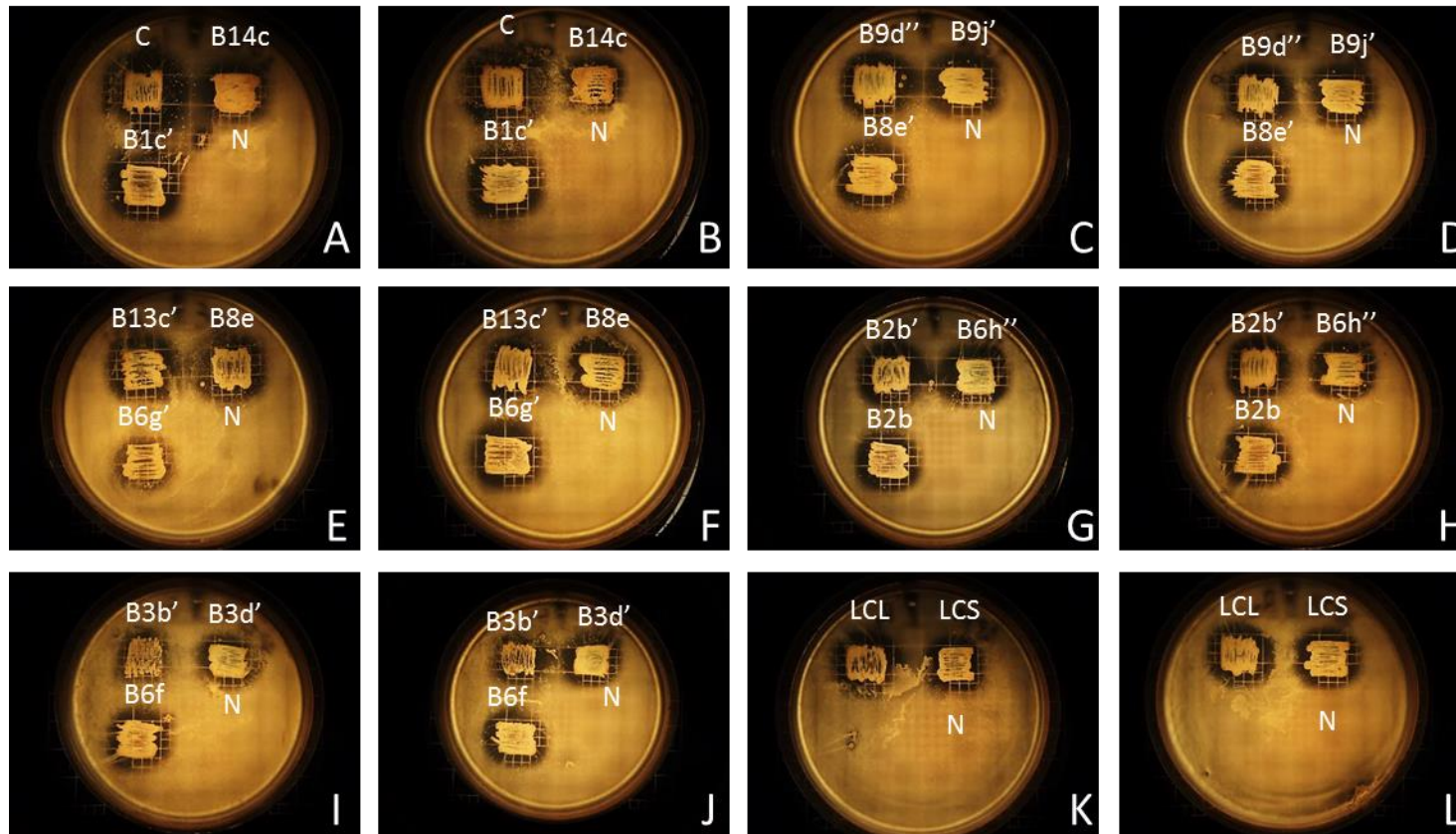


Figura 12. Halos de inhibición de las BAL's contra EPEC. BAL's inoculadas en agar APT con sobrecapa de agar Luria y EPEC, incubadas a 37 °C/24 h. A y B: duplicados para B14c, C y B1c'; C y D: duplicados para B9j', B9d'' y B8e'; E y F: duplicados para B8e, B13c' y B6g'; G y H: duplicados para B6h'', B2b' y B2b; I y J: duplicados para B3d', B3b' y B6f; K y L: duplicados para *L. casei* Shirota (LCS) y *L. casei* Lalacult® (LCL). Control negativo: agua destilada estéril (N)

Tabla 12. Resultados de la determinación cualitativa del efecto antimicrobiano. Para cada ensayo los resultados sombreados indican los mayores resultados de inhibición, siendo el sombreado con rojo el mejor resultado. Los resultados sombreados en azul pertenecen a las cepas probióticas comerciales.

Cepa	Resultado de inhibición				
	S. Typhi	S. Enteritidis	Listeria monocytogenes	V. cholerae No 01	EPEC
<i>L. casei</i> Shirota	+	+	++	+++	+
<i>L. casei</i> Lalacult®	++	++	++	+++	++
C	+++	++++	++++	++++	++++
B9j'	++	+++	+	+++	+++
B2b'	+++	+	+++	++	++
B1c'	+	+++	+++	++	++
B8e	+	+++	++	++	+++
B13c'	++++	++	+	++	++
B3b'	+++	-	+	+	+
B9d''	++	++	+++	++	++
B6g'	+++	++	+	+	+
B2b	+	+	+++	++	++
B6h''	+	+	++	++	+++
B6f	+	++	++	++	+++
B3d'	++	+	++	++	+++
B8e'	++	++	++	++	++
B14c	+	++	+	+	+

La selección de las cepas con el mejor efecto antimicrobiano se efectuó mediante la comparación de los diámetros de inhibición con respecto a las cepas de referencia.

Del ensayo cualitativo de actividad antimicrobiana se observó que la cepa designada como C mostró una mayor actividad, especialmente contra *L.*

monocytogenes. La tendencia contra este patógeno se observó en varias de las cepas seleccionadas. Por otra parte la menor inhibición se observó contra *V. cholerae* No 01, posiblemente debido a características propias de la especie (Balamuragan *et al.*, 2012). En BAL's la producción de ácidos orgánicos (láctico y acético, principalmente) es el principal mecanismo responsable del efecto antimicrobiano, gracias a las altas concentraciones con que se producen. Para el caso de *L. monocytogenes* se ha reportado que los péptidos de bajo peso molecular con actividad antimicrobiana son los principales agentes producidos por BAL's encargados de inhibir su desarrollo, debido a su composición de membrana. (Zaccharof y Lovitt, 2012). Sin embargo también se ha reportado en BAL's la producción de otros compuestos tales como peróxido de hidrógeno, diacetilo o reuterina, los cuales cuentan con un mayor espectro de actividad antimicrobiana y no son específicos para la cepa (Makras *et al.*, 2006; Spinler *et al.*, 2008; Dillon, 2014).

Para el caso de las cepas de referencia se ha registrado a *L. casei* como productora de altas concentraciones de lactato y bajas de acetato y con alta capacidad de acidificar su medio, así como capaz de producir péptidos con actividad antimicrobiana (Tejero-Sariñena *et al.*, 2012; Zacharof y Lovit, 2012; Hor y Liang, 2014).

De este ensayo todas las cepas mostraron actividad antimicrobiana, siendo aquellas etiquetadas como C, B9j', B2b', B1c' y B8e las que presentaron los mejores resultados de inhibición. La cepa B8e presentó una alta inhibición contra *S. Enteritidis* y EPEC; la mayor inhibición por parte de la cepa B1c' se observó contra *S. Enteritidis* y *L. monocytogenes*; mientras que B2b' inhibió satisfactoriamente a *S. Typhi* y *L. monocytogenes*. La cepa B9j' mostró altos niveles de inhibición contra tres patógenos (*S. Enteritidis*, *V. cholerae* No 01 y EPEC). Sin embargo la cepa etiquetada como C fue aquella que dio los mayores niveles de actividad antimicrobiana contra *S. Enteritidis*, *L. monocytogenes*, *V.*

cholerae No 01 y EPEC, en tanto que la inhibición del crecimiento de *S. Typhi* fue alta. Para todas estas cepas los niveles de desarrollo en el medio con pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares fue alto, salvo para la cepa C, el cual fue medio; sin embargo todas presentaron un alto nivel de recuperación al ser transferidas en agar MRS sin acidez ni sales biliares. En función los resultados de las determinaciones cualitativas del efecto antimicrobiano y de la resistencia a acidez y sales biliares se ha seleccionado a la cepa C como aquella con el mayor potencial probiótico.

5. Determinación de la concentración celular de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares.

La cepa C fue seleccionada por los resultados mostrados de las evaluaciones cualitativas de resistencia y de efecto antimicrobiano, por lo que se determinaron sus concentraciones de desarrollo antes y después de ser sometida a condiciones de pH 3.5 y presencia de sales biliares. Los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 12.

Tabla 13. Resultados de la evaluación cuantitativa de la resistencia a acidez y presencia de sales biliares.

Cepa	Concentración (UFC/mL)	
	Previa a la exposición a caldo MRS pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares	Recuperación posterior a la exposición a caldo MRS pH 3.5 y 0.3 % de sales biliares
C	3×10^9	2×10^8
<i>L. casei</i> Shirota	8×10^8	0
<i>L. casei</i> Lalacult®	2×10^9	0

Aunque aún no se ha establecido una dosis diaria de microorganismos probióticos a consumir, con el objetivo de presentar beneficios en la salud del consumidor, algunos estudios han establecido que a partir de concentraciones de 10^6 UFC/mL pueden empezar a registrarse beneficios en la salud del consumidor, sin embargo se recomiendan un consumo de concentraciones mayores a 10^9 UFC/mL, para que las células puedan llegar en concentraciones mínimas de 10^8 UFC/mL al lumen intestinal. En la industria alimentaria se ha adoptado la adición de bacterias probióticas en concentración mínima de 10^6 UFC/mL, para que con un consumo diario mínimo de 100 g del producto se puedan ingerir cantidades adecuadas del probiótico (Yuki *et al.*, 1999; Saad *et al.*, 2013; Tripathi y Giri, 2014). La concentración de la cepa C antes de ser sometida a las condiciones de acidez y presencia de sales biliares fue de 3×10^9 UFC/mL, en tanto que después de la exposición a tales condiciones fue de 2×10^8 UFC/mL. En comparación con los niveles de desarrollo para la cepa *Leuconostoc mesenteroides* P45, reportados por Campos (2010) y Matus (2011), a pesar de que los niveles de desarrollo previo a la exposición a acidez y sales biliares de la cepa C son menores (concentraciones del orden de 10^{10} UFC/mL), los niveles de desarrollo posterior al estrés de ésta son notablemente mayores, al haber reportado 400 UFC/mL. En lo que respecta a las concentraciones para las cepas de referencia, éstas fueron de 8×10^8 y 2×10^9 para *L. casei* Shirota y *L. casei* aislado de Lalacult® previo al estrés, respectivamente, sin embargo ambas cepas no mostraron viabilidad después de estas condiciones, probablemente debido a las condiciones en que se efectuó esta determinación. En relación a otros estudios las concentraciones de desarrollo reportadas, posteriores a la exposición a acidez y sales biliares, abarcan desde 10^4 hasta 10^9 UFC/mL, aunque cabe destacar la diferencia en la ejecución de los ensayos de resistencia al ambiente intestinal *in vitro* entre este y los demás estudios: la exposición a altas condiciones de acidez y presencia de sales biliares se ejecuta en ensayos independientes y en tiempos de exposición que, en la mayoría de los casos, no sobrepasa 180 min, no así de manera simultánea y

durante 24 h como en este estudio (Pan *et al.*, 2009; Jensen *et al.*, 2012; Monteagudo-Mera *et al.*, 2012; Senaka *et al.*, 2012; Argyri *et al.*, 2013; García-Ruiz *et al.*, 2014; Teixeira *et al.*, 2014).

La cepa C mostró una capacidad de resistencia y recuperación indiscutiblemente mayor que las cepas probióticas comerciales y, aunado a las altas concentraciones celulares determinadas, cumple con las características reportadas en la literatura para ser considerada como un posible probiótico comercial. Junto con estos altos niveles de desarrollo se debe contemplar la mayor actividad antimicrobiana de esta cepa que aquella de las cepas probióticas comerciales, lo cual hace que la cepa C posea un interesante potencial probiótico.

6. Identificación molecular de BAL's mediante el análisis la secuencia del gen rDNA 16S

Se efectuó la extracción del DNA cromosomal, se amplificó y purificó el gen DNAr 16S de las siguientes 9 cepas sin identificar: B1c', B3b', B3d', B6g', B6h'', B8e, B13c', B14c' y C. En la figura 13 se observa una fotografía del gel de electroforesis en agarosa para el DNA cromosomal extraído, destacándose un producto de extracción íntegro. En la figura 13 se aprecia la fotografía del gel de electroforesis en agarosa para los productos de PCR, que consisten en fragmentos de aproximadamente 1.5 Kb, y que corresponden a los genes 16S DNAr de las cepas a identificar (Weisburg, 1991). En la figura 15 se observan la fotografía del gel de electroforesis en agarosa con los productos de PCR purificados.

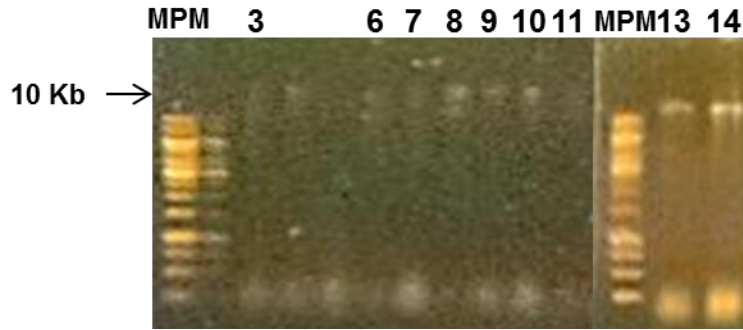


Figura 13. Gel de electroforesis en agarosa 1 % p/v + 0.04 % EtBr para la extracción de DNA cromosomal. Velocidad de corrida: 90 V. Se depositaron 5 μ L de muestra + 3 μ L de colorante. Carriles: 3 – cepa B14c; 6 – cepa C; 7 – cepa B1c’; 8 – cepa B8e; 9 – cepa B13c’; 10 – cepa B6g’; 11 – cepa B6h’’; 13 – cepa B3d’; 14 – cepa B3b’; MPM – Marcador de Peso Molecular O’Generule™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific) Se observan bandas en la parte baja del gel con peso menor a 250 bp, probablemente tratándose de plásmidos circulares covalentemente cerrados; mientras que en la parte superior, debajo de las bandas de DNA cromosomal, las bandas observadas puedan corresponder a plásmidos lineares.

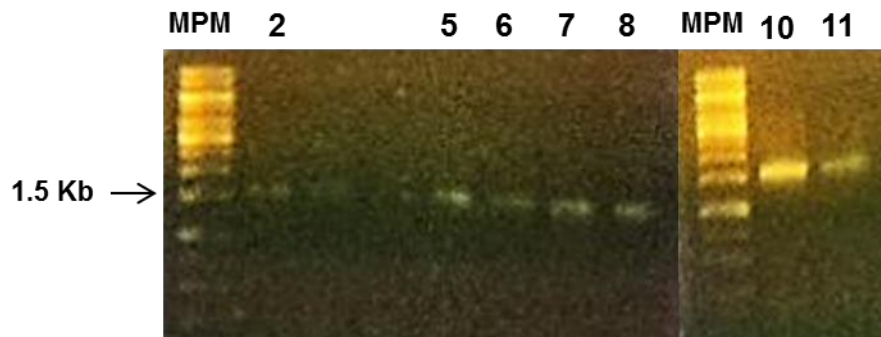


Figura 14. Gel de electroforesis en agarosa 1 % p/v + 0.04 % EtBr para los productos de PCR. Velocidad de corrida: 90 V. Se depositaron 5 μ L de muestra + 3 μ L de colorante. Carriles: 2 – cepa B14c; 5 – cepa B8e; 6 – cepa B13c’; 7 – cepa B6g’; 8 – cepa B6h’’; 10 – cepa C; 11 – cepa B1c’; MPM – Marcador de Peso Molecular O’Generule™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

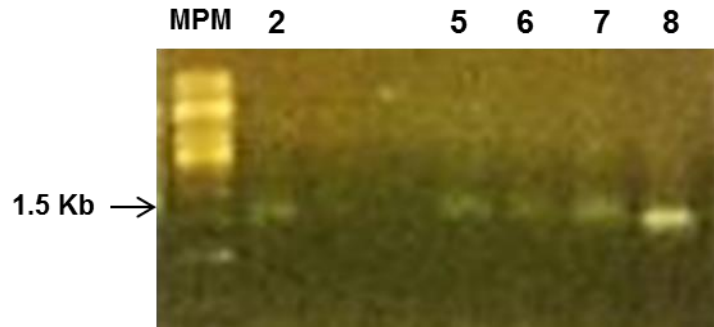


Figura 15. Gel de electroforesis en agarosa 1 % p/v + 0.04 % EtBr para los productos de PCR purificados. Velocidad de corrida: 90 V. Se depositaron 5 μ L de muestra + 3 μ L de colorante. Carriles: 2 – cepa B14c; 5 – cepa B8e; 6 – cepa B13c'; 7 – cepa B6g'; 8 – cepa B6h''; MPM – Marcador de Peso Molecular O'Generule™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific).

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados y visualizados posteriormente con el programa Finch TV, para después ensamblarlos (fD1 + rD1) y obtener la secuencia consenso completa del gen 16S rDNA. Con ésta se logró determinar su identidad taxonómica empleando la base de datos de GenBank, utilizando el programa Blastn. En la tabla 13 se muestran los resultados obtenidos, junto con los parámetros que confirman tal identidad. Las características morfológicas y microscópicas, catalasa, e identidad para las 15 cepas seleccionadas se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Identidad de secuencias.

Cepa	Tamaño de secuencia (bp's)	Identidad	% Identidad	Valor de expectancia	% Cobertura	Número de acceso (respecto al resultado más cercano)
B1c'	1461	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270	99	0.0	89	KM257681.1
B3b'	1457	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270	99	0.0	90	KM257681.1
B3d'	1454	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa Floractive 19058-4	99	0.0	92	HE983621.1
B6g''	1439	<i>Lactobacillus brevis</i> cepa 12-2	99	0.0	89	EU744192.1
B6h''	1460	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa Floractive 19058-4	99	0.0	90	HE983621.1
B8e	1444	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 411	99	0.0	88	KM670023.1
B13c'	1457	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa LGC 3	99	0.0	86	KM806299.1
B14c	1424	<i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa GKY 8/1B	99	0.0	90	KC481591.1
C	1443	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 416	99	0.0	89	KM670024.1

Tabla 15. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas

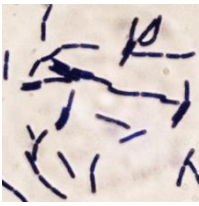



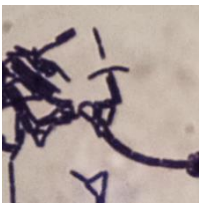
Cepa	Secuencia con mayor similitud	Catalasa	Características coloniales	Características microscópicas	Imagen
B1c'	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270	Negativo	Colonias puntiformes, chicas, blancas, brillantes, butiráceas y convexas.	Estreptobacilos largos Gram (+)	
B2b	<i>Lactobacillus casei</i> cepa W 56	Negativo	Colonias puntiformes convexas, blancas, brillantes y butiráceas	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B2b'	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa LN-1	Negativo	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B3b'	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270	Negativo	Colonias puntiformes, aparentemente planas, blancas, traslúcidas y brillantes	Estreptobacilos largos Gram (+)	
B3d'	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa Floractive 19058-4	Negativo	Colonias puntiformes, planas, blancas y brillantes.	Estreptobacilos largos Gram (+)	

Tabla 15. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas (continuación)

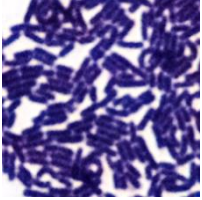

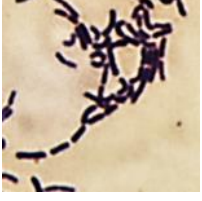
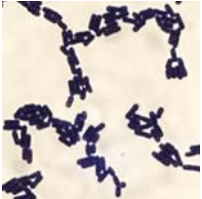
Cepa	Secuencia con mayor similitud	Catalasa	Características coloniales	Características microscópicas	Imagen
B6f	Bacteria no cultivable, clona MY 99, cercanamente relacionada con <i>Lactobacillus plantarum</i>	Negativo	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B6g''	<i>Lactobacillus brevis</i> cepa 12-2	Negativo	Colonias redondas, chicas, convexas, con borde definido, blancas y brillantes.	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B6h''	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa Floractive 19058-4	Negativo	Colonias puntiformes, planas, blancas, traslúcidas, butiráceas y brillantes.	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B8e	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 411	Negativo	Colonias puntiformes, planas, blancas, traslúcidas, brillantes y butiráceas	Bacilos cortos	

Tabla 15. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas (continuación)



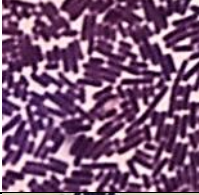

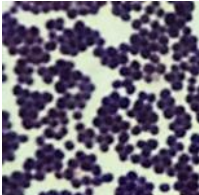
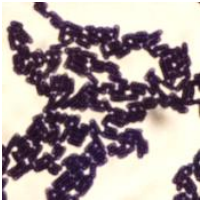
Cepa	Secuencia con mayor similitud	Catalasa	Características coloniales	Características microscópicas	Imagen
B8e'	Bacteria sin cultivar, clona MY 99, cercanamente relacionada a <i>Lactobacillus plantarum</i>	Negativo	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B9d''	<i>Lactobacillus casei</i> cepa W 56	Negativo	Colonias redondas, chicas, con borde liso, convexas, blancas, brillantes y butiráceas.	Bacilos largos Gram (+)	
B9j'	<i>Lactobacillus brevis</i>	Negativo	Colonias puntiformes, blancas y butiráceas.	Bacilos cortos Gram (+)	
B13c'	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa LGC 3	Negativo	Colonias redondas, chicas, convexas, con borde definido, blancas y brillantes	Estreptobacilos cortos Gram (+)	
B14c	<i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa GKY 8/1B	Positivo	Colonias redondas, chicas, convexas, con borde definido, blancas, opacas y de superficie brillante	Estafilococos	

Tabla 15. Características morfológicas y microscópicas de las cepas seleccionadas (continuación)

Cepa	Secuencia con mayor similitud	Catalasa	Características coloniales	Características microscópicas	Imagen
C	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 416	Negativo	Colonias puniformes, blancas, butiráceas y brillantes.	Bacilos cortos Gram (+)	

De igual forma se pudieron identificar las siguientes especies: *L. brevis* (2 cepas), *L. casei* (2 cepas), *L. paracasei* (5 cepas), *L. plantarum* (3 cepas) y *S. epidermidis* (1 cepa), junto con dos cepas de bacterias no cultivables relacionadas con *L. plantarum*. Además, de la identificación ejecutada anteriormente en el grupo de trabajo del IBT también se identificaron otras especies como *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y especies pertenecientes al género *Bacillus*. La proporción de los géneros identificados se muestra en la tabla 15.

De todas las cepas de la colección de BAL's, 40 (33.3%) fueron identificadas, y de éstas se observó un predominio del género *Leuconostoc*, en especial de *L. mesenteroides*, al representar un 41% de las especies identificadas. Al relacionar estos resultados con los estudios de las poblaciones microbianas del pulque efectuados por Escalante *et al.*, (2004; 2008), al igual que con los de Campos (2010), se observó una correlación con éstos debido a que el género *Leuconostoc* constituye una de las poblaciones más importantes en la colección; también las especies del género *Lactobacillus* destacaron por su presencia, ya que constituyeron cerca del 30% de aquellas identificadas.

Tabla 16. Especies de BAL's identificadas dentro de la colección

Género	Especie	Número de aislados	Cepas	Proporción
<i>Bacillus</i>	<i>amyloliquefaciens</i>	1	B8a	2 %
<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>	1	B7e'	2 %
<i>Lactobacillus</i>	<i>brevis</i>	3	B6g'', B9j, B9j'	7 %
	<i>casei</i>	1	B2b,	2 %
	<i>paracasei</i>	5	B1c', B3b', B3d', B6h'', B8a'	13 %
	<i>plantarum</i>	3	B8e, B13c', C	7 %
<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>	2	B3b (caja 5, celda 26), B3b (caja 5, celda s/n Ln 2)	5 %
	<i>fallax</i>	2	B3c, B11f'	5 %
<i>Leuconostoc</i>	<i>mesenteroides</i>	16	B1a', Bid', B1f, B2a', B2c''', B5f, B5h', B7c', B9a, B9d, B10a, B10b', B10c, B10e, B12b'	41 %
<i>Staphylococcus</i>	sp.	2	B9e, B11f	5 %
	<i>epidermidis</i>	1	B14c	3 %
	<i>hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i>	1	B6h,	3%
Bacterias no cultivables, relacionadas con <i>L. plantarum</i>		2	B6f, B8e'	5 %

Al analizar las especies presentes se observó la presencia de algunas no reportadas en los estudios de Escalante (2004; 2008), tales como *Lactobacillus brevis*, *L. casei*, *L. paracasei* y *Leuconostoc fallax*. Esta variación es un factor importante para la detección de nuevos microorganismos con potencial probiótico y con otras aplicaciones biotecnológicas. La cepa C, seleccionada como aquella con el mayor potencial probiótico, fue identificada como *L. plantarum*, al igual que las B13c' y B8e. Dicho resultado contrasta con lo obtenido por Campos (2010) y Matus (2011), quienes lograron identificar a *Leuconostoc mesenteroides* cepa P45 como una probable cepa probiótica. Se han reportado distintas cepas de *L. plantarum*, con esta característica, la mayoría provenientes de alimentos fermentados de origen vegetal, entre las que se reportan WCFS1, NCB, 299v (DSM 9843), MFI 298 y AD2 (Jensen *et al.*, 2012). En relación con el estudio de Makarova *et al.* (2006), el análisis del genoma completo de *L. plantarum* ha permitido hallar genes relacionados con la producción de prebacteriocinas, en el transporte de péptidos antimicrobianos, en una mayor síntesis de ácidos teicóicos (con una probable participación en la integridad de membrana ante condiciones de estrés gastrointestinal), en la capacidad de adherencia y en la expresión de la enzima hidrolasa de sales biliares.

Las cepas B1c', B2b', B3b', B3d' y B6h'' fueron identificadas como *L. paracasei*, mientras que B2b y B9d'' lo fueron para *L. casei*. Esta es la primera vez que se detectan estas especies de lactobacilos en pulque, ya que su presencia no fue reportada por Escalante (2004; 2008) en muestras provenientes de Hidalgo, Estado de México y Morelos; ni por Gutiérrez (2015) en pulque de Morelos, aunque en este último estudio también se encontró a *L. brevis*, otra especie que no había sido reportada anteriormente en esta bebida. La presencia de *L. casei* y *L. paracasei* es bastante común en distintos alimentos fermentados, tanto comerciales como tradicionales (Rivera-Espinoza y Gallardo Navarro; 2010; Socol *et al.*, 2012).

Tanto *L. casei* como *L. paracasei* han sido una de las cepas con mayor reporte de probióticas, e inclusive las cepas de *L. casei* Shirota, DN 114-001 e Immunitas y de *L. paracasei* cepa CNCM I-4034 ya son empleadas comercialmente (Dietrich, Koffman y Alavi, 2014; Liévin-Le Moal y Servin, 2014; Swati *et al.*, 2014). Al analizar el genoma de estas especies se han hallado genes implicados en la sobrevivencia a presencia de acidez y sales biliares y en la producción de compuestos con actividad antimicrobiana (Makarova *et al.*, 2006). Entre estas cepas se encuentran dos que presentaron altos niveles de desarrollo ante la presencia de acidez y sales biliares y que mostraron altos niveles de inhibición de los microorganismos patógenos: B2b' y B1c'. El hallazgo de estas especies, descritas con importante capacidad probiótica, refuerza los usos terapéuticos adjudicados a esta bebida.

Entre la selección de cepas potencialmente probióticas se identificó a las cepas B6h'' y B9j' como *L. brevis*. Si bien este microorganismos no figura como uno de los principales probióticos empleados comercialmente, se han descrito algunas cepas con actividad probiótica, como la cepa LB32 (Mojgani, Hussaini y Vaseji, 2015). El potencial probiótico de esta especie puede sustentarse en los resultados obtenidos por Makarova *et al.*, (2009), que al igual que para *L. plantarum* y *L. casei*, se detalló la presencia de genes responsables de estas características. En comparación con los resultados obtenidos por Gutiérrez (2015), se destaca una menor presencia de esta especie que en las muestras de pulque suave proveniente de Huitzilac, Morelos, aunque éstas como las provenientes de la región Mixteca brindaron un importante potencial probiótico.

En las cepas de la colección también se identificaron especies no pertenecientes al grupo de las bacterias lácticas, como lo fueron *Bacillus amyloliquefaciens* y aquellas pertenecientes al género *Staphylococcus*. En el primer caso su presencia

se ha reportado en el pulque, dado que las especies de este género son habitantes nativas tanto de la planta como del suelo (Escalante *et al.*, 2004; 2008). La presencia de especies pertenecientes al género *Staphylococcus* se puede explicar por una contaminación durante su proceso de producción por parte de los productores (tlachiqueros), ya que constituyen parte de la microbiota normal en epidermis. Dadas su importancia clínica y los bajos niveles de inhibición, no se puede considerar a esta cepa como una cepa probiótica.

El árbol filogenético, construido con las secuencias del gen 16S rDNA de las cepas analizadas y con secuencias de referencia se muestra en la figura 14. Este análisis permitió corroborar la identidad obtenida por el análisis con BLAST y la posición de las secuencias en el árbol filogenético. En este análisis se incluyó la secuencia de *L. casei* cepa Shirota obtenida por Gutiérrez (2015).

Se observa que las cepas designadas como B8e, B13c' y C quedaron agrupadas dentro del nodo de *L. plantarum*, lo cual indica que pertenecen a esta especie, sin embargo podría sugerirse que B13c' y C son una misma cepa distinta a B8e. Los datos para *L. plantarum* cepa KLB 411 (KM670023.1) indican que fue aislado de un ambiente vaginal humano (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM670023.1>, última accesión el día 24 de Marzo de 2015), lo que podría sugerir que las cepas B8e, B13c y C pudieran adaptarse a otras mucosas humanas como la gastrointestinal. Ello deberá asegurarse con pruebas *in vivo*. En el nodo de *L. brevis* quedó agrupada la cepa B6g, quedando identificada como esta especie. De acuerdo a los datos disponibles para *L. brevis* cepa 12-2 (EU744192.1), este microorganismo fue aislado de muestras de pepinillos encurtidos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/EU744192.1>, última accesión el día 24 de Marzo de 2015). Tanto el pulque como este alimento encurtido presentan características similares tales como provenir de fuentes vegetales y contar con una alta acidez, lo cual podría indicar una adaptación natural de este microorganismo a ambientes con bajo pH. Las cepas B1c', B3d', B6h'' y B8b

fueron agrupadas en el nodo de *L. paracasei*. La cepa de *L. paracasei* WVS270 fue aislada de biopelículas presentes en equipos de madera para la elaboración artesanal de quesos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KM257681.1>, última accesoión el 24 de Marzo de 2015), con lo que podría suponerse que estas especies son capaces de adaptarse también a ambientes lácteos y que podrían contar con posibles aplicaciones en estos alimentos. De manera similar a las cepas de *L. plantarum* aisladas, las cepas B6h'' y B1c' podrían tratarse de la misma cepa, así como B3d' y B8b.

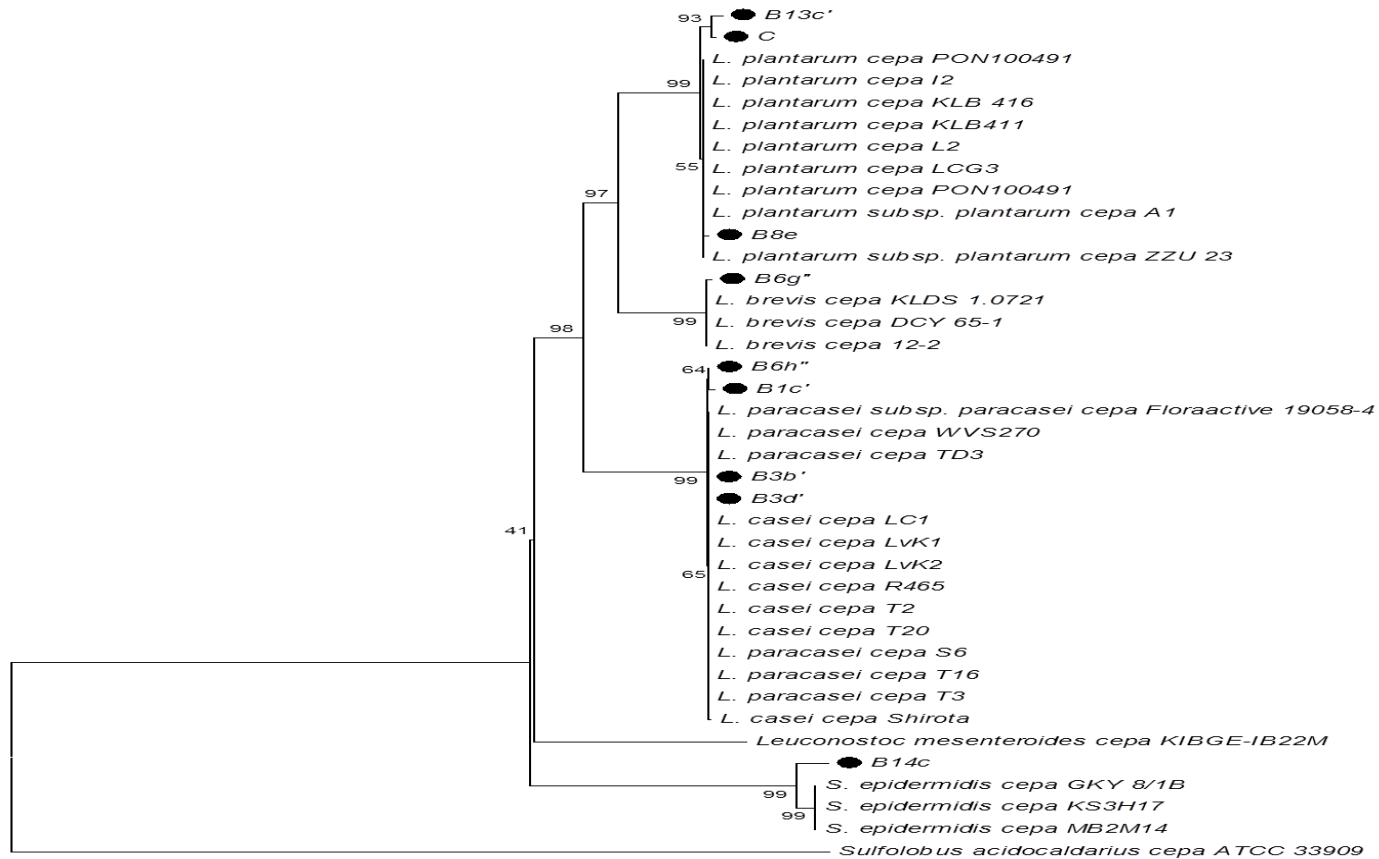


Figura 16. Árbol filogenético con las secuencias identificadas y las secuencias de referencia. La construcción del árbol se obtuvo a partir del método de agrupamiento de Neighbor-Joining. Los números especifican el número de veces que se mantiene la topología de las ramas sobre mil grupos analizados, mediante la prueba de filogenia Bootstrap. Se utilizó como grupo externo a *Sulfolobus acidocaldarius*. Las secuencias de las cepas del proyecto aparecen señaladas junto a un círculo negro.

7. Identificación de BAL's por sistemas bioquímicos miniaturizados

Otra manera de corroborar la identidad de la cepa analizada fue mediante la determinación de su perfil bioquímico, cuyo resultado para la cepa C mediante el sistema API 50 CH se muestran en la tabla 16. Este análisis también se efectuó con la cepa de *L. casei* Shirota, con el fin de verificar la precisión de la identificación.

Tabla 17. Identidades obtenidas por el sistema API 50 CH® de BioMérieux™

Cepa	Sistema API 50 CH®		
	Identidad taxonómica	% Identidad	Nivel de confianza
C	<i>Lactobacillus plantarum</i>	93.6	Muy buena
LCS	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.0	Muy buena

Aunque la base de datos del sistema API 50 CH está estructurada a partir del perfil bioquímico de cepas tipo, se obtuvo el mismo resultado que con la identificación molecular para la cepa en estudio, mientras que para la cepa de referencia se obtuvo un resultado distinto. Además de lograr identificar a la cepa, este análisis proporcionó información muy importante de su perfil bioquímico (Anexo 2). La cepa C puede ser clasificada como facultativa heterofermentativa, ya que es capaz de asimilar tanto hexosas como algunas pentosas. El mismo caso se observa para la cepa de referencia. Otro aspecto importante es la capacidad de utilizar carbohidratos con actividad prebiótica, ya que esta es una característica deseada en cepas probióticas. Esta característica se confirma para ambas cepas, con el empleo de celobiosa y trehalosa para ambas y de melecitosa también para la cepa C.



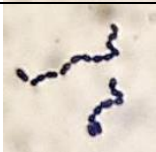

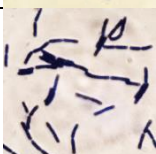


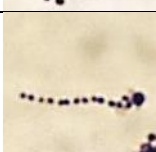
Conclusiones

De un total de 146 cepas de bacterias lácticas que componen esta colección, únicamente 15 (9.73%) presentaron una probable actividad probiótica de interés, al lograr mantener su viabilidad tras la exposición a condiciones de acidez y presencia de sales biliares e inhibir el desarrollo de microorganismos patógenos. De éstas se eligió a la cepa C, identificada como *Lactobacillus plantarum*, como aquella cepa con la mayor actividad probiótica en las pruebas *in vitro*. Las cepas B9j', identificada como *L. brevis*; B8e, identificada como *L. plantarum*; y B2b' y B1c', identificadas como *L. paracasei*, también mostraron un potencial probiótico importante.. Igualmente se identificaron otras cepas como *L. brevis* y *L. paracasei*, que contaron con un potencial probiótico menor a las cepas indicadas anteriormente. Cabe mencionar también que se reportó por primera vez la presencia de *L. casei* y *L. paracasei* en pulque. Estos resultados confirman la presencia de dicha actividad entre las cepas de esta colección.



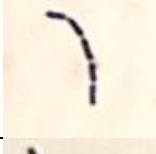
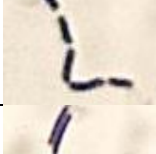


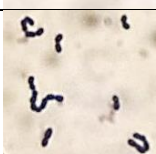
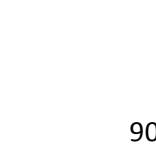
Perspectivas

- Determinar las concentraciones celulares de las cepas B1c', B2b', B8e y B9j' antes y después de ser sometidas a condiciones de pH 3.5 y 0.3% de sales biliares.
- Identificación de las cepas B1c', B2b', B8e y B9j' por sistemas bioquímicos miniaturizados.
- Efectuar ensayos cuantitativos de actividad antimicrobiana con las cepas B1c', B2b', B8e, B9j' y C.
- Evaluar el potencial probiótico de la cepa C *In vivo*.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de la cepa C.
- Determinar la naturaleza química del agente responsable de la actividad antimicrobiana.
- Determinar la capacidad de adherencia a epitelio intestinal.






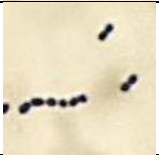

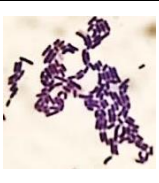

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña.

Cepa	Morfología microscópica	Gram	Catalasa	Características morfológicas	Identidad taxonómica	Imagen
B1a	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B1a'	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B1a'	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B1c	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B1c'	Estreptobacilos largos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270**	
B1d	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B1d'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293*	
B1f	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B1f'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B1g	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B1g'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B1g''	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B1i	Estreptobacilos largos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	Si	
B1i'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2a	Cocos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B2a'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> *	

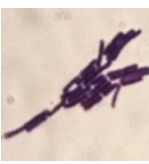


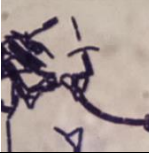
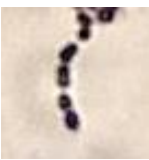
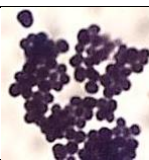


Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B2b	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus casei</i> W56*	
B2b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2b'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa LN-1*	
B2b''	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2c	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B2c'	Estreptoacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2c''	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B2c'''	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	


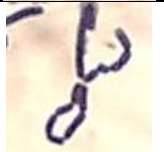
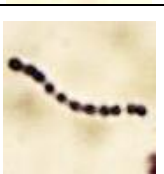





Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación)

B2d'	Cocos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2e	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B2e	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B2e'	Cocos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2e'	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B2e''	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B2j	Cocos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B3b (caja 3, celda 26)	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc citreum</i> cepa C2*	
B3b (caja 5, celda s/n Ln 2)	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc citreum</i> cepa C2*	


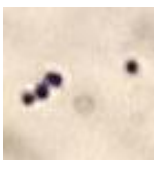
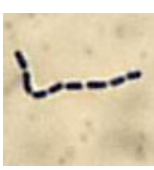
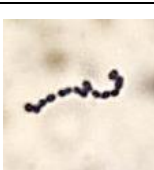



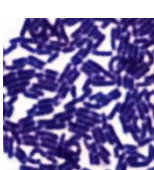
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B3b'	Estreptobacilos largos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Lactobacillus paracasei</i> cepa WVS270**	
B3c	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	<i>Leuconostoc fallax</i> KTC 3537 cepa DSM 20189*	
B3c'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B3d'	Estreptobacilos largos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa Floractiva 19058-4**	
B3e	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B3e'''	Estafilococos	+	+	Colonias puntiformes, blancas, y opacas	SI	
B4i	Bacilos cortos	+	+	Colonias puntiformes chicas, blancas, opacas y con borde liso.	SI	
B5b	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	







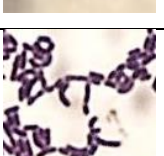


Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B5c'	Cocos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B5e	Estreptobacilos cortos	+	+	Colonias puntiformes chicas, blancas, opacas y con borde liso.	SI	
B5e'	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B5f	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B5f'	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso	SI	
B5g	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B5h	Cocos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso	SI	
B5h	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso	SI	



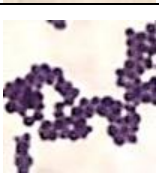

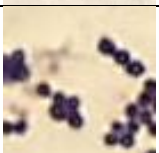



Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B5h'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B5i	Cocos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B5i	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B6a	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B6-9	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B6c	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B6c'	Cocos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B6f	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	Bacteria no cultivable, clona MY99, cercanamente relacionada con <i>Lactobacillus plantarum</i> **	

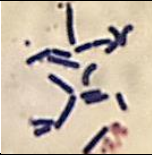



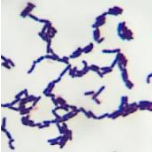

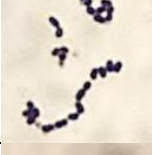

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B6f'	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B6g	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B6g'	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B6g''	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	<i>Lactobacillus brevis</i> cepa 12-2	
B6h	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B6h	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Staphylococcus hominis</i> ssp. <i>novobiosepticus</i> cepa GTC1228*	
B6h'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B6h'	Estafilococos	+	+	Colonias puntiformes chicas, blancas, opacas y con borde liso.	SI	
B6h''	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>Paracasei</i> cepa Floractive 19058-4**	


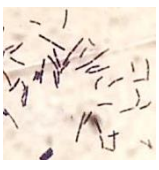


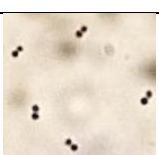
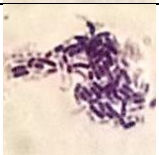


Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B6h''	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B6i'	Bacilos cortos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B7a	Cocos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B7b	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B7c'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp. <i>mesenteroides</i> ATCC 8293*	
B7d	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B7e'	Cocos	+	-	Colonias puntiformes chicas, blancas, opacas y con borde liso.	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> cepa NCDO 04*	
B7g	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	

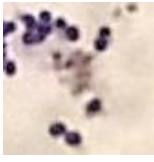

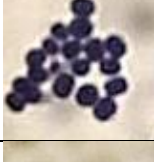
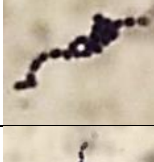

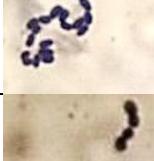


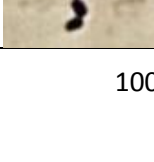
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B8a	Bacilos largos	+	+	Colonias puntiformes chicas, blancas, opacas y con borde liso.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> cepa FZB42*	
B8a'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> cepa R094*	
B8d	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B8e	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 411*	
B8e'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas	Bacteria no cultivable, clona MY99, cercanamente relacionada con <i>Lactobacillus plantarum</i> *	
B8f'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B9a	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B9b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	



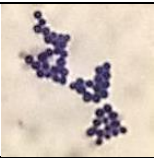

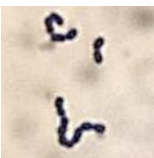


Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B9d	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B9d''	Bacilos largos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Lactobacillus casei</i> cepa W 56**	
B9e	Estafilococos	+	+	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Staphylococcus</i> sp. JP44SK55*	
B9g	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B9h'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B9j	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus brevis</i> *	
B9j'	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas y butiráceas.	<i>Lactobacillus brevis</i> *	
B10a	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8923*	




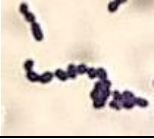

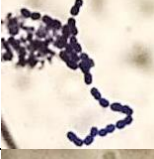

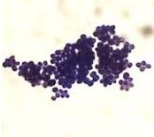
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B10a	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B10a'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B10a'	Estafilococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B10b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B10b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B10b'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B10c	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	
B10d	Bacilos largos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B10e	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa NCFB 529*	

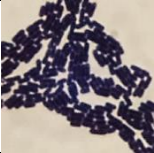
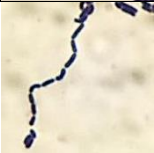
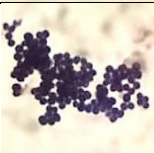




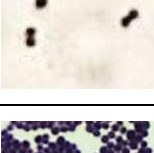
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B10g	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B11d	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B11f	Estafilococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas y opacas.	<i>Staphylococcus</i> sp. ZQ4*	
B11f'	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	<i>Leuconostoc fallax</i> KCTC 3537 cepa DSM 20189*	
B12a	Diplococos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B12a'	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B12b	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B12b	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	

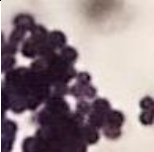


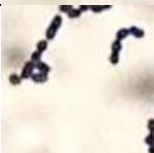
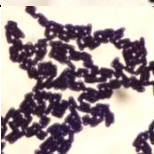

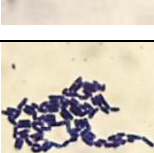
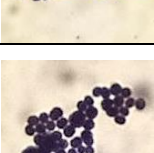
Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B12b'	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> cepa THK-D433	
B12b''	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B12c	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
B12c'	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B12e	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B13a	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B13b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B13b''	Cocos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	



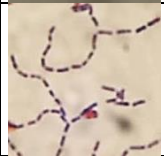

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B13c'	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa LGC 3**	
B13d	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B13d'	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, opacas, y con borde liso.	SI	
B14a	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B14a	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B14b	Cocos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
B14b'	Cocos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
B14c	Estafilococos	+	+	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> cepa GKY 8/1B**	

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintas muestras de pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación).

B14d	Estafilococos	+	+	Colonias puntiformes, blancas, opacas y butiráceas.	SI	
B14e	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
a	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
b	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
c	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	<i>Lactobacillus plantarum</i> cepa KLB 416**	
d	Diplococos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	
e	Bacilos cortos	+	-	Colonias redondas medianas, blancas, brillantes y con borde liso.	SI	
f	Cocos	+	-	Colonias redondas chicas, blancas, brillantes, butiráceas y con borde liso.	SI	

Anexo 1. Características morfológicas y microscópicas, Gram y prueba de la catalasa para las cepas de bacterias lácticas aisladas de distintos pulques de la Mixteca Oaxaqueña (continuación)

g	Diplococos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
h	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	SI	
L. casei aislado de Lalacult®	Estreptobacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.		
L. casei Shirota	Bacilos cortos	+	-	Colonias puntiformes, blancas, brillantes y butiráceas.	L. casei cepa Shirota***	

SI: Sin identificar; *: Identificadas en el grupo de trabajo del IBT-UNAM; **: Identificadas en este proyecto; *** Identificada por Gutiérrez (2015)

Anexo 2: sistemas de detección API-50 CH de Biomérieux

El sistema API-50 CH se basa en la degradación de sustratos. Para ello cuenta con 49 distintos sustratos, los cuales son:

Control	-	INO	Inositol	MLZ	Melezitosa
GLY	Glicerol	MAN	Manitol	RAF	Rafinosa
ERY	Eritritol	SOR	Sorbitol	AMD	Almidón
DARA	D-Arabinosa	MDM	α -Metil-D-Manósido	GLYG	Glicógeno
LARA	L-Arabinosa	MDG	α -Metil-D-Glucósido	XLT	Xilitol
RIB	Ribosa	NAG	N-Acetil-glucosamina	GEN	Gentibiosa
DXYL	D-Xilosa	AMY	Amigdalina	TUR	D-Turanosa

LXYL	L-Xilosa	ARB	Arbutina	LYX	D-Lixosa
ADO	Adonitol	ESC	Esculina	TAG	D-Tagatosa
MDX	B-Metil-D-xilósido	SAL	Salicina	DFUC	D-Fucosa
GAL	Galactosa	CEL	Celobiosa	LFUC	L-Fucosa
GLU	Glucosa	MAL	Maltosa	DARL	D-arabitol
FRU	Fructosa	LAC	Lactosa	LARL	L-Arabitol
MNE	Manosa	MEL	Melibiosa	GNT	Gluconato
SBE	Sorbosa	SAC	Sacarosa	2KG	2-Cetogluconato
RHA	Ramnosa	TRE	Trehalosa	5KG	5-Cetogluconato
DUL	Dulcitol	INU	Inulina		

Este sistema es capaz de identificar taxonómicamente lactobacilos, aunque en el caso de especies aisladas de ambientes naturales o de alimentos fermentados puede haber discrepancia en comparación a identificaciones moleculares.

Los perfiles bioquímicos obtenidos por este sistema, para ambas cepas, fueron los siguientes:

Cepa	C		LCS		Cepa	C		LCS		Cepa	C		LCS	
	24	48	24	48		Tiempo	24	48	24		48	Tiempo	24	48
Control	-	-	-	-	INO	-	-	-	+	MLZ	+	+	-	-
GLY	-	-	-	-	MAN	+	+	+	+	RAF	-	-	-	-
ERY	-	-	-	-	SOR	-	-	+	+	AMD	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	MDM	-	-	-	-	GLYG	-	-	-	-
LARA	+	+	-	-	MDG	-	-	+	+	XLT	-	-	-	-
RIB	+	+	+	+	NAG	+	+	+	+	GEN	+	+	+	+
DXYL	-	-	-	-	AMY	+	+	+	+	TUR	+	+	+	+
LXYL	-	-	-	-	ARB	+	+	+	+	LYX	-	-	-	+
ADO	-	-	+	+	ESC	+	+	-	-	TAG	+	+	+	+

MDX	-	-	-	-	SAL	+	+	+	+	DFUC	-	-	-	-
GAL	+	+	+	+	CEL	+	+	+	+	LFUC	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	MAL	+	+	+	+	DARL	-	-	-	-
FRU	+	+	+	+	LAC	+	+	+	+	LARL	-	-	-	-
MNE	+	+	+	+	MEL	-	-	-	-	GNT	-	-	+	+
SBE	-	-	+	+	SAC	+	+	+	+	2KG	-	-	-	-
RHA	+	+	-	-	TRE	+	+	+	+	5KG	-	-	-	+
DUL	-	-	-	-	INU	-	-	-	-					

Bibliografía

- Alemán, M., Jiménez, P., Onofre, B., Ortega, U., Ramírez, A., Rodríguez, N., y Velasco, A. (2012). *Los recuerdos del porvenir. Las pulquerías de la Ciudad de México*. México D.F.: Colectivo El Tinacal.
- Aunbjerg, S., Honoré, A., Marcussen, J., Ebrahimi, P., Vogensen, F., Benfeld, C., Skov, Y. y Knøchel, S. (2014). Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 194: 46-53
- Backstrand, J., Allen, L., Martinez, E., y Pelto, G. (2001). Maternal consumption of pulque, a traditional central Mexican alcoholic beverage: relationship to infant growth and development. *Public Health Nutrition*, 4: 883-891.
- Backstrand, J., Goodman, A., Allen, L., y Pelto, G. (2004). Pulque intake during pregnancy and lactation in rural Mexico: alcohol and child growth from 1 to 57 months. *European Journal of Clinical Nutrition*, 4: 1626-1634.
- Balamuragan, A., Chandragunasekaran, G., Chellappan, G., Rajaram, K., Ramamoorthi, G. y Ramakrishna, B. (2014) Probiotic potential of lactic acid bacteria present in homemade curd in southern India. *Indian Journal of Medical Research*(140), 345-355.
- Banco de Normas Mexicanas [Internet]. Chapingo, Edo Mex: Colegio de Posgraduados de Chapingo; 2010 [Acceso el 3 de Diciembre de 2014]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-022-1972.PDF>.
- Banco de Normas Mexicanas [Internet]. Chapingo, Edo Mex: Colegio de Posgraduados de Chapingo; 2010 [Acceso el 3 de Diciembre de 2014]. Disponible en: <http://www.colpos.mx/bancodenormas/nmexicanas/NMX-V-037-1972.PDF>.

- Barrangou, R., Lahtinen, S., Ibrahim, F. y Ouwehand, A. (2012). Genus *Lactobacillus*. En S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen, y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (77-92). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Begley, M., Gahan, C., y Hill, C. (2005). The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews*, 29: 625-651.
- Bienenstock, J., Gibson, G., Klaenhammer, T., Walker, W., y Neish, A. (2013). New insights into probiotic mechanisms. A harvest from functional and metagenomic studies. *Gut Microbes*, 2: 94-100.
- Campos, I. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias lácticas del pulque con capacidad probiótica. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, Distrito Federal, México.
- Cervantes, A. (2010). Identificación de cepas de bacterias lácticas por criterios fenotípicos y análisis de secuencias del gen ADN ribosomal 16s. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Collado, M., Meriluoto, J., y Salminen, S. (2007). *In vitro* analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40: 629-636.
- Dalié, D., Deschamps, A., y Richard-Forget, F. (2010). Lactic acid bacteria - Potential for control of mould growth and mycotoxins: A review. *Food Control*, 21: 370-380.
- De Castro, S., y Pérez, J. (2006). Fisiopatología y patogenia general del aparato digestivo. En S. De Castro, y J. Pérez, *Manual de Patología General* (338-345). Barcelona: Masson.

- Dillon, V. (2014). Preservative effects during storage. En R. Robinson, *Encyclopedia of Food Microbiology* (941-947). Liverpool: Elsevier.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Esquivel, G., Matus, V., Moreno, R., López-Munguía, A., y Lappe-Oliveiras, P. (2012). Pulque Fermentation. En Y. Hui, *Handbook of Plant-Based Fermented Food Beverage Technology* (691-706). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Escalante, A., Giles-Gómez, M., Hernández, G., Córdova-Aguilar, M. S., López-Munguía, A., Gosset, G., y Bolívar, F. (2008). Analysis of bacterial community during the fermentation of pulque, a traditional Mexican alcoholic beverage, using a polyphasic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 124: 126-134.
- Escalante, A., Rodríguez, M. E., Martínez, A., López-Munguía, A., Bolívar, F., y Gosset, G. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS microbiology letters*, 235: 273-279.
- Flint, H., Scott, K., Duncan, S., Louis, P., y Forano, E. (2012). Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes*, 4: 289-306.
- Gänzle, M., y Vogel, R. (2003). Studies on the mode of action of reutericyclin. *Applied and Environmental Microbiology*, 2: 1305-1307.
- Gänzle, M., Hölzel, A., Walter, J., Jung, G., y Hammes, W. (2000). Characterization of reutericyclin produced by *Lactobacillus reuteri* LTH2584. *Applied and Environmental Microbiology*, 10, 4325-4333.
- Gänzle, M., Vermeulen, N. y Vogel, R. (2007). Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. *Food Microbiology*, 24, 128-138.

- García-Ruiz, A., González, D., Esteban-Fernández, A., Requeña, T., Bartolomé, B., y Moreno-Arribas, V. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from wine. *Food Microbiology*, 44: 220-225.
- Garde, S., Gómez, N., Hernández, M., y Ávila, M. (2014). Susceptibility of *Clostridium perfringens* to antimicrobials produced by lactic acid bacteria: Reuterin and nisin. *Food Control*, 44: 22-25.
- Garneau, S., Martin, N., y Vederas, J. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*, 84: 577-592.
- Gaspar, P., Carvalho, A., Vinga, S., Santos, H. y Rute-Neves, A. (2013) From physiology to systems metabolic engineering for the production of biochemicals by lactic acid bacteria. *Biotechnology advances*, 31: 764-788.
- Godoy, A., Herrera, T. y Ulloa, M. (2003). *Más allá del pulque y el tepache. Las bebidas alcohólicas no destiladas indígenas de México*. Distrito Federal: Instituto de Investigaciones Antropológicas.
- Gourbeyre, P., Denery, S., y Bodinier, M. (2011). Probiotics, prebiotics and symbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *Journal of Leukocyte Biology*, 89: 685-695.
- Gutiérrez, E. (2015) . Detección de lactobacilos aislados del pulque con capacidad probiótica. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México.
- Hor, Y., y Liong, M. (2014). Use of extracellular extracts of lactic acid bacteria and bifidobacteria for the inhibition of dermatological pathogen *Staphylococcus aureus*. *Dermatologica Sinica*, 32: 141-147.
- Huys, G., Leisner, J. y Björkroth, J. (2012). The lesser LAB gods: *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weisella*, *Carnobacterium* and affiliated genera.. En S.

- Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen, y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (93-122). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Jensen, H., Grimmer, S., Naterstad, K. y Lars, A. (2012) *In vitro* testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 153: 216-222.
- Kim, P. Sohng, J., Sung, C., Joo, H., Kim, E., Yamaguchi, T., Park, D. y Kim, B. (2010). Characterization and structure identification of an antimicrobial peptide, homicin, produced by *Staphylococcus hominis* MBBL 2-9. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399: 133-138.
- Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C., y Reuter, G. (1998). Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 41: 103-125.
- Kotrba, P., Inui, M. y Yukawa, H. (2001). Bacterial phosphotransferase system (PTS) in carbohydrate uptake and control of carbon metabolism. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 6: 502-517.
- Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas, R., Arrizón-Gaviño, J., Herrera-Suárez, T., García-Mendoza, A. y Gschaedler-Mathis, A. (2008). Yeasts associated with the production of Mexican alcoholic nondistilled and distilled Agave beverages. *FEMS Yeast Research*, 8: 1037-1052.
- Liu, S. (2003). Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 115-131.
- Makarova, K. *et al.*, (2006). Comparative genomics of lactic acid bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 42; 15611-15616.

- Makras, L., Triantafyllou, V., Fayol-Messaoudi, D., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A., y De Vuyst, L. (2006). Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Research in Microbiology*, 157: 241-247.
- Maldonado, J., Wilde, P., Macierzanka, A., y Mackie, A. (2011). The role of bile salts in digestion. *Advances in Colloid and Interface Science*, 165: 36-46.
- Masco, L., Crockaert, C., Van Hoorde, K., Swings, J., y Huys, G. (2007). *In vitro* assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin. *Journal of Dairy Science*, 9: 3572-3578.
- Mathur, S. y Singh, R. (2005) Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria – A review. *International Journal of Food Microbiology*(105), 281-295.
- Matus, V. (2011). Caracterización de la capacidad probiótica de bacterias lácticas aisladas del pulque. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM, Distrito Federal, México.
- Messens, W., y De Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 72: 31-43.
- Mitsuoka, T. (2014) Development of functional foods. *Bioscience of microbiota, food and health*(33), 117-128.
- Monteagudo-Mera, A., Rodríguez, L., Rúa, J., Martínez, H., Navasa, N., García, M., y Ferrero, M. (2012). *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. *Journal of Functional Foods*, 4: 531-541.

- Morales, J., Camacho, M., y Bourges, H. (2005). Amino acid composition of some Mexican foods. *Archivo Latinoamericano de Nutrición*, 2: 172-186.
- Morelli, L., Calleagri, M. L., Kvist, F. y Von Wright, A. (2012). Genetics of lactic acid bacteria. En S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (17-38). Boca Ratón, Florida: CRC Press.
- Nes, I., Kjos, M. y Diep, D. B. (2012). Antimicrobial components of lactic acid bacteria. En S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (285-288). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Ouoba, L., Lei, V., y Jensen, L. (2008) Resistance of potential lactic acid bacteria and bifidobacteria from African and European origin to antimicrobials: Determination and transferability of the resistance genes to other bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 217-224
- Pan, X., Chen, F., Wu, T., Tang, H., y Zhao, Z. (2009). The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*, 20: 598-602.
- Perez, R., Zendo, T., y Sonomoto, K. (2014) Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial cell factories*, 13: 1-13
- Pía, M., Pérez, G. y Font, G. (2006). Effect of bile acid on the cell membrane functionality of lactic acid bacteria for oral administration. *Research in Microbiology*, 157: 720-725.
- Ramírez, A. (13 de Enero de 2010). Evaluación del efecto prebiótico del aguamiel de maguey (*Agave salmiana*) en *Lactobacillus delbrueckii* subsp.

bulgaricus. Tesis de maestría. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología, IPN, México D.F., México.

- Ramírez, J., Sánchez-Marroquín, A., Álvarez, M. y Valyasebi. (2004). Industrialization of mexican pulque. En K. Streinkaus, *Industrialization of Indigenous Fermented Foods* (548-575). New York: Marcel Dekker.
- Rivera-Espinoza, Y., Gallardo-Navarro, Y. (2010) Non-dairy probiotic products. *Food microbiology*, 27: 1-11.
- Riveros-McKay, F., Campos, I., Giles-Gómez, M., Bolívar, F. y Escalante, A. (2014). Draft genome sequence of *Leuconostoc mesenteroides* P45 isolated from pulque, a traditional Mexican alcoholic fermentes beverage. *Genome Announcement*, 2: e01130-14.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J., y Bressollier, P. (2013). An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT - Food Science and Technology*, 50: 1-16.
- Schaefer, L., Auchtung, T., Hermans, K., Whitehead, D., Borhan, B. y Britton, R. (2010). The antimicrobial compound reuterin (3-hydroxypropionaldehyde) induces oxidative stress via interaction with thiol groups. *Microbiology*, 156: 1589-1599.
- Senaka, C., Evans, C., Adams, M., y Baines, S. (2012). *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cella adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yoghurt. *Food Research International*(49), 619-625.
- Servin, A. y M., C. (2003). Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa ad interaction with patogens. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 5. 741-754.

- Socol, C., De Dea-Lindner, J., Tiemi-Yamaguishi, C., Rigon-Spier, M., De Souza-Vanderberghe, L. y Socol, V. (2012) Probiotic non-dairy beverages. En Hui, Y. y Özgül, E., *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology* (707-728). Florida: CRC Press.
- Spinler, J., Taweechotipatr, M., Rognerud, C., Ou, C., Tumwasorn, S. y Versalovic, J. (2008). Human derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*, 14: 166-171.
- Tabasco, R., Fernández, P., Fontecha, J., Peláez, C. y Requena, T. (2014). Competition mechanisms of lactic acid bacteria and bifidobacteria: fermentative metabolism and colonization. *LWT - Food Science and Technology*, 55: 680-684.
- Teixeira, J., Seeras, A., Sanchez, A., Zhang, C., Shu-wei, M. y Gänzle, M. (2014). Glutamine, glutamate and arginine-based acid resistance in *Lactobacillus reuteri*. *Food Microbiology*, 42: 172-180.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G. y Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: Evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18: 530-538.
- Torres-Rodríguez, I., Rodríguez-Alegría, M., Miranda-Molina, A., Giles-Gómez, M., Conca, R., López-Munguía, A., Bolívar, F. y Escalante, A. (2014). Screening and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Leuconostoc kimchii* isolated from traditional fermented pulque beverage. *SpringerPlus*, 3: 583.
- Tripathi, M., y Giri, S. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9: 225-241.

- Vieira, A., Teixeira, M. y Martins, F. (2013). The role of probiotics and prebiotics in inducing gut immunity. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-12.
- Von Wright, A. (2012). Genus *Lactococcus*. En S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (63-76). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Von Wright, A. y Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: an introduction. En S. Lahtinen, A. Ouwehand, S. Salminen y A. Von Wright, *Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects* (1-16). Boca Raton, Florida: CRC Press.
- Weisburg, W., Barnes, S., Pelletier, D. y Lane, D. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173: 697-703.
- Welman, D. y Maddox, I. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 6: 269
- Wu, R., Zhang, W., Sun, T., Wu, J., Yue, X., Meng, H. y Zhang, H. (2011). Proteomic analysis of responses of a new probiotic bacterium *Lactobacillus casei* Zhang to low acid stress. *International Journal of Food Microbiology*, 147: 181-187.
- Yang, S., Lin, C., Sung, C. y Fang, J. (2014). Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. *Frontiers in Microbiology*, 5: 241.
- Yuki, N., Watanabe, K., Mike, A., Tagami, Y., Tanaka, R., Ohwaki, M. y Morotomi, M. (1999). Survival of a probiotic, *Lactobacillus casei* strain Shirota, in the gastrointestinal tract: Selective isolation from faeces and identification using monoclonal antibodies. *International Journal of Food Microbiology*, 48: 51-57.

Zacharof, M. y Lovitt, R. (2012). Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria. A review article. *APCBEE Proceedia*, 12: 50-56.

Zendo, T. (2013). Screening and characterization of novel bacteriocins from lactic acid bacteria. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 5: 893–9.