



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA *in vitro* DE LA CEPA
DE *Leuconostoc* P45 AISLADA DEL PULQUE.**

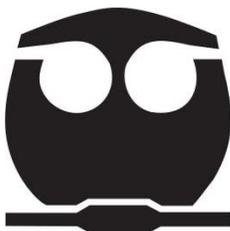
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

PRESENTA:

IRENE CERÓN MARTINEZ



MÉXICO, D.F

2014



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.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA *in vitro* DE LA CEPA DE
Leuconostoc P45 AISLADA DEL PULQUE.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: QFB. ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

VOCAL: Dr. JOSÉ ADELFO ESCALANTE LOZADA

SECRETARIO: Dr. FRANCISCO RUIZ TERAN

1° SUPLENTE: M en B. BEATRIZ RUIZ VILLAFAN

2° SUPLENTE: M en B. MARTHA GILES GÓMEZ

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 4 del Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. José Adelfo Escalante Lozada

SUPERVISOR TÉCNICO:

M en B. Martha Giles Gómez

SUSTENTANTE:

Irene Cerón Martínez

Este trabajo contó con el apoyo financiero del Proyecto PAPIIT IN207914. Durante la realización de este trabajo se contó con una beca de licenciatura / elaboración de tesis dentro de éste proyecto PAPIIT.

Se reconoce y agradece las siguientes colaboraciones:

Dra Amelia Farrés González Saravia. Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM, por su apoyo en la parte de la localización celular de la prebacteriocina.

Dr. Carlos A. Eslava Campos. Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina, UNAM, por el asesoramiento en los ensayos de adherencia a líneas celulares.

M. B. Ramón de Anda Herrera, por su ayuda en la preparación de SDS-PAGE

A Mercedes Enzaldo y Aurelia Ocampo por la asistencia técnica.

INDICE

RESUMEN	9
GENERALIDADES	11
1. ALIMENTOS Y BEBIDAS FERMENTADAS.....	11
2. PULQUE.....	14
2.1 Microorganismos presentes durante la fermentación del pulque.....	15
2.2 Potencial biotecnológico del <i>Agave</i>	17
3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL).....	18
3.1 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL.....	21
3.1.1 Ácidos orgánicos.....	21
3.1.2 Peróxido de hidrógeno y otros metabolitos del oxígeno.....	22
3.1.3 Dióxido de carbono.....	24
3.1.4 Compuesto aromáticos.....	24
3.1.5 Compuestos inhibitorios de bajo peso molecular.....	24
3.1.6 BLIS (Bacteriocin Like Inhibitory Sustances).....	25
3.1.7 PGH (Péptido Glucano Hidrolasa).....	25
4. BACTERIOCINAS.....	26
4.1 Clasificación de las bacteriocinas.....	28
4.2 Modo de acción de las bacteriocinas.....	31
4.2.1 Clase I. Lantibióticos.....	31
4.2.2 Clase II. No lantibióticos.....	33
4.3 Biosíntesis de las bacteriocinas clase II.....	35
4.4 Organización genética de las bacteriocinas.....	35
5. FERMENTACIÓN.....	37
6. GENERALIDADES DE <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	40
6.1 Producción de exopolisacáridos (EPS).....	41
6.1.1 Hemo-EPS.....	42
6.1.2 Homo-EPS.....	42
7. PROBIÓTICO.....	44
7.1 Criterios de selección de probióticos.....	44
7.2 Microorganismos usados como probióticos.....	46
7.3 Mecanismo de acción de los probióticos.....	47
7.4 Microbiota del tracto gastrointestinal.....	48
JUSTIFICACIÓN	51
HIPÓTESIS	51
OBJETIVOS	52
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. MICROORGANISMOS, LINEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	53
2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CEPA P45 BAJO CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE EPS.....	53

3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA P45.....	54
3.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana producida por los sobrenadantes de la cepa P45.....	55
3.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de muestras de sobrenadantes liofilizadas, células enteras, lisados celulares y citosol de la cepa P45 en presencia y ausencia de producción de EPS.....	55
4. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA Y PROTEINAS CON ACTIVIDAD ANITMICROBIANA MEDIANTE ANÁLISIS EN SDS-PAGE Y ZIMOGRAMAS.....	58
4.1 SDS-PAGE.....	58
4.1.1 Purificación de proteínas presentes en los sobrenadantes de cultivos de la cepa P45 (Precipitación con sulfato de amonio y diálisis).....	58
4.2 Zimograma.....	59
5. ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR IN VITRO.....	61
5.1 Condiciones de crecimiento de las líneas celulares.....	61
5.2 Subcultivo de las líneas celulares.....	61
5.3 Preparación de la microplaca.....	62
5.4 Preparación del inóculo bacteriano.....	62
5.5 Prueba de adhesión bacteriana.....	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CEPA P45 BAJO CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE EPS.....	64
1.1 Capacidad de producción de EPS.....	64
2. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA P45.....	66
2.1 Evaluación de la capacidad antimicrobiana producida por los sobrenadantes de la cepa P45.....	67
2.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana de muestras de sobrenadantes liofilizadas.....	68
2.2.1 Muestras de sobrenadantes de cultivos en caldo APT sin sacarosa.....	68
2.2.2 Muestras de sobrenadantes de cultivos en caldo APT más sacarosa.....	68
2.2.3 Muestras de células enteras, lisados celulares y citosol de la cepa P45 en caldo APT y caldo APT con sacarosa.....	70
3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA Y PROTEINAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	72
3.1 SDS-PAGE.....	72
3.2 Zimograma.....	73
4. ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR IN VITRO.....	75
4.1.1 Ensayos de adherencia bacteriana de P45 contra células HEp-2.....	75
4.1.2 Ensayos de adherencia bacteriana de P45 contra células HT-29.....	82
4.1.3 Ensayos de adherencia bacteriana de P45 contra células Caco-2.....	83
4.1.4 Ensayos de adherencia bacteriana de P45 contra células HeLa.....	84
CONCLUSIONES.....	81

REFERENCIAS.....	82
ANEXO.....	85

INDICE DE FIGURAS

Fig 1. Árbol filogenético de las secuencias de ADNr 16S detectadas en agua miel y muestras de pulque.....	17
Fig 2. Árbol filogenético de <i>Lactobacillales</i> construidos sobre la base de alineaciones concatenadas de ADNr 16S.....	19
Fig 3. Estructura del peptidoglucano y especificidad de hidrólisis de enlaces de peptidoglucano hidrolasas...	26
Fig 4. Ejemplo de los daños causados por bacteriocinas sobre células en fase exponencial de <i>Listeria monocytogenes</i> CECT4032.....	28
Fig 5. Estructura del lantibiótico (A) nisina y (B) mersacidina.....	31
Fig 6. Modelo que muestra el mecanismo de acción de las bacteriocinas clase I y II.....	33
Fig 7. Regulación de la síntesis de la enterocina A de <i>Enterococcus faecium</i> (no lantibiótico).....	35
Fig 8. Organización genética de los operones de la enterocina A de <i>Enterococcus faecium</i>	36
Fig 9. Cluster de genes que codifican tanto para bacteriocinas conocidas y previstas como para el sistema de transporte de bacteriocinas.....	36
Fig 10. (a) Ruta homofermentativa y (b) Ruta heterofermentativa de utilización de lactosa de las bacterias del ácido láctico.....	38
Fig 11. Relaciones filogenéticas del género <i>Leuconostoc</i> basado en la secuencia de genes 16S rRNA.....	41
Fig 12. Mecanismos de acción de los probióticos.....	48
Fig 13. Funciones de la microbiota del tracto gastrointestinal.....	49
Fig 14. Evolución de la microbiota intestinal con la edad.....	49
Fig 15. Metodología general de la obtención de las fracciones celulares de la cepa P45.....	56
Fig 16.. Halos de inhibición alrededor de colonias inoculadas con <i>L. mesenteroides</i> P45 en agar APT + Sac 20.....	6
Fig 17. Halos de inhibición de sobrenadantes de cultivos liofilizados de LP45 contra a) <i>E.coli</i> Dα5 b) <i>Listeria monocitogenes</i> y c) <i>Staphylococcus aureus</i>	68
Fig 18. Difusión en agar de muestras de sobrenadante concentradas (2X) de <i>L. mesenteroides</i> P45 durante 48 h en agar APT.....	70
Fig 19. Halos de inhibición de muestras de sobrenadante liofilizadas (20x) de <i>L. mesenteroides</i> P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT.....	71
Fig 20. Halos de inhibición de muestras de sobrenadante liofilizadas (20x) de <i>L. mesenteroides</i> P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT + sacarosa.....	72

Fig 21. Halos de inhibición de células de <i>L. mesenteroides</i> P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT+sacarosa 20%)	70
Fig 22. Comparación de los halos de inhibición antimicrobianos de la cepa P45 en las diferentes condiciones de cultivo	72
Fig 23. . Electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio al 15% de bacteriocina (10kDa) precipitada con (NH ₄) ₂ SO ₄ a partir de los sobrenadantes de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> P45 a las 24 y 48 h de fermentación	72
Fig 24. Zimograma a) (15% acrilamida) y b) (8% acrilamida) de actividad lítica de los sobrenadantes liofilizados producidos por LP45 celular contra <i>Micrococcus lysodenticus</i>	74
Fig 25. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HEp-2 (Carcinoma faríngeo)	77
Fig 26. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HT-29 (Adenocarcinoma colonrectal)	78
Fig 27. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células Caco-2 (Adenocarcinoma colonrectal)	79
Fig 28. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HeLa (Carcinoma de cérvix)	80

INDICE DE FIGURAS

Tabla 1. Características generales del genoma de BAL	20
Tabla 2. Enzimas del metabolismo del oxígeno y sus derivados	22
Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas	29
Tabla 4. Alimentos y bebidas fermentadas y sus bacterias lácticas asociadas	39
Tabla 5. Géneros de bacterias de ácido láctico, tipo de fermentación y productos	40
Tabla 6. Homo EPS producidos por BAL	43
Tabla 7. Criterios de selección de los microorganismos probióticos	45
Tabla 8. Características adicionales de los microorganismos probióticos	45
Tabla 9. Principales especies microbianas utilizadas como probióticos	48
Tabla 10. Cepas bacterianas y líneas celulares	56
Tabla 11. Preparación del gel de poliacrilamida	60
Tabla 12. Moléculas de la cepa P45 con efectos antimicrobianos	70

RESUMEN

La cultura gastronómica de México incluye una bebida conocida como "pulque", una bebida obtenida a partir de la fermentación natural de la savia (aguamiel) extraída de diferentes especies de magueyes (*Agave americana*, *A. ferox*, *A. atrocensis*, *A. salmiana var salmaiana*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga*). Se ha propuesto que el proceso de fermentación comienza en el maguey, donde microorganismos naturales presentes en el aguamiel fermentan los carbohidratos disponibles. Todo el proceso se realiza en condiciones no asépticas, por lo tanto, la mezcla de microorganismos implicados en el proceso de fermentación está asociada a la diversidad bacteriana presente en aguamiel y a los incorporados durante su recogida, transporte, inoculación con pulque previamente fermentado y durante la manipulación (Escalante et al., 2004).

El valor cultural de esta bebida reside en el hecho de que es producida y consumida prácticamente de la misma forma que en la antigüedad. Se ha utilizado también en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, que pueden ser explicadas por el posible papel probiótico-prebiótico, asociado a las bacterias lácticas y azúcares presentes en el aguamiel, respectivamente.

En nuestro grupo de trabajo se aislaron previamente de una muestra de pulque procedente de la localidad de Huitzilac, Morelos, una colección de 13 bacterias lácticas capaces de tolerar *in vitro* condiciones de pH ácido (3.0) y presencia de sales biliares (0.3%) que simulan las condiciones antimicrobianas a las que se ven sometidas aquellas bacterias que pasan a través del estómago y del intestino delgado; y que presentaron también la capacidad de inhibición *in vitro* el crecimiento de patógenos como *Escherichia coli* EPEC, *Salmonella entérica typhi*, *S. entérica typhimurium* y *Listeria monocytogenes*. De estos aislados se seleccionó la cepa identificada como *Leuconostoc* P45, la cual presentó las

mejores características en cuanto a viabilidad después del tratamiento antimicrobiano e inhibición de bacterias patógenas. La capacidad probiótica de esta cepa fue evaluada también *in vivo* en ratones BALB/c de ocho semanas, administrándola oralmente por 7 días, contra la infección de una cepa de *S. entérica typhimurium* st^r, presentando en hígado y bazo una disminución de uno o dos ciclos logarítmicos en la infección.

Con estos antecedentes, en el presente proyecto se pretende identificar si la actividad antimicrobiana presentada por esta cepa está asociada a un componente tipo bacteriocina asociada a la superficie celular o al sobrenadante de cultivos en medio líquido; evaluar esta capacidad *in situ* por medio de zimogramas; identificar si la actividad probiótica de la cepa P45 está asociada a la presencia de bacteriocinas o productos del metabolismo tales como ácido láctico; y por otro lado, determinar si la capacidad de producción de polisacáridos extracelulares asociada a esta bacteria, favorece su capacidad probiótica a partir de la evaluación de la capacidad de inhibición *in vitro* de bacterias patógenas, sobrevivencia a condiciones antimicrobianas (pH ácido y presencia de sales biliares) y su capacidad de adhesión a modelos celulares *in vitro*.

GENERALIDADES

1. ALIMENTOS Y BEBIDAS FERMENTADAS

Se estima que las prácticas de fermentación - uno de los procesos biotecnológicos más antiguos - han existido desde hace 9000 A. C. en China, con la fermentación de una bebida compuesta de arroz, miel y fruta la cual se producía aproximadamente al mismo tiempo que la cerveza de cebada y el vino de uva en el Medio Oriente. La calidad del producto fermentado, su uso y consumo en cada país son diferentes, este se basa en la cultura y la disponibilidad de las materias primas disponibles en cada país, llevándose a cabo de forma artesanal y sin ningún conocimiento de la posible función de los microorganismos involucrados. En la actualidad, hay alrededor de 5000 variedades de alimentos y bebidas fermentadas elaboradas a base de leche, vegetales o frutas y que son consumidas en todo el mundo (Corsetti et al., 2004).

La biopreservación se refiere a brindar una vida útil más larga y una mayor seguridad a los alimentos utilizando microorganismos y/o sus metabolitos. Generalmente se emplean bacterias ácido lácticas (BAL) porque contribuyen significativamente al sabor, textura y, en muchos casos, al valor nutricional de los productos alimenticios. Las BAL se utilizan como iniciadores naturales y ejercen un efecto antimicrobiano como resultado de diferentes procesos metabólicos tales como: el metabolismo de la lactosa, enzimas proteolíticas, la captación de citrato, resistencia a bacteriófagos, la producción de bacteriocinas, la biosíntesis de polisacáridos, la resistencia de iones metálicos y resistencia a los antibióticos. (Corsetti et al., 2004). Además juegan un papel clave en fermentaciones de alimentos en los que no sólo contribuyen al desarrollo de las propiedades sensoriales deseadas en el producto final sino también a su seguridad microbiológica.

Las BAL tiene un estatus GRAS (generalmente reconocidos como seguros, por sus siglas en inglés) y se ha estimado que el 25% de la dieta de los europeos y el 60% de la dieta de muchos países en desarrollo consiste en alimentos fermentados (Stiles et al., 1996).

La fermentación es una de las tecnologías más antiguas y más importantes para el procesamiento de alimentos. La fermentación es un proceso de conservación eficiente, lo que aumenta la vida útil y disminuye la necesidad de refrigeración u otras formas de tecnologías de preservación de los alimentos, proporciona una forma natural de mejorar el valor nutricional de los alimentos a través de la síntesis de aminoácidos esenciales y vitaminas además de mejorar la digestibilidad de los alimentos.

Por otra parte, debido a las cualidades organolépticas de los alimentos fermentados tradicionales, una amplia investigación sobre su biodiversidad microbiana ha sido llevada a cabo con el objetivo de reproducir esas cualidades, en un entorno controlado. Estos incluyen el aislamiento y la identificación de microorganismos asociados con las fermentaciones y la determinación de su papel exacto en el proceso de fermentación, utilizando tanto los enfoques microbiológicos como moleculares (Steinkraus, 2002).

Las principales fermentaciones en alimentos son las siguientes:

A. Fermentaciones de alimentos llevadas a cabo en presencia de altas concentraciones de sal. La adición de sal en rangos de 13% p/v o superior a sustratos ricos en proteínas origina una hidrólisis controlada de proteínas que evita la putrefacción e impide el desarrollo de toxinas en alimentos.

B. Fermentaciones ácido lácticas. En estas fermentaciones los azúcares fermentables se convierten en ácido láctico por BAL como *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus brevis*, *L. plantarum*, *Pediococcus cerevisina*, *Streptococcus thermophilus*, *S. lactis*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. citrovorum*, *Bifidobacterium bifidus*, etc. (Tamang et al., 2010).

C. Fermentaciones de alimentos relacionados con la producción de etanol.

Estos incluyen vinos, kaffir sudafricano, cerveza de sorgo y pulque mexicano. Se trata de un proceso biológico de fermentación, originado por la actividad de algunos microorganismos como levaduras y bacterias ácido lácticas que procesan los carbohidratos de sustratos como miel diluida, el jugo de la caña de azúcar, la savia de palma, jugos de frutas, cereales germinados o almidón hidrolizado, para obtener como productos finales: etanol, dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Marshall et al., 2011).

D. Fermentaciones de alimentos relacionados con la producción de ácido acético.

Cuando los productos de la fermentación alcohólica se mantienen en aerobiosis, las bacterias que pertenecen al género *Acetobacter* y que están presentes en el medio ambiente oxidan porciones del etanol a ácido acético, el cual es aún más conservante que el etanol (Marshall et al., 2011).

E. Fermentaciones de alimentos que implican condiciones altamente alcalinas con liberación de amoníaco libre.

Los microorganismos esenciales son *Bacillus subtilis* y otros bacilos relacionados, los cuales son muy proteolíticos. El amoníaco es liberado y se alcanza un pH de 8.0 o mayor. La combinación de alto pH y amoníaco libre, junto con un crecimiento muy rápido de los microorganismos esenciales a temperaturas relativamente altas - por encima de 40 °C - hacen que sea muy difícil el crecimiento de otros microorganismos (Marshall et al., 2011).

Durante los últimos años, los consumidores conscientes de la salud están buscando alimentos naturales sin conservantes químicos. Algunos ejemplos de alimentos y aditivos fabricados usando procesos de fermentación industriales en los países en desarrollo son:

- Las bebidas alcohólicas, como vinos y la cerveza
- Leche y productos lácteos, incluyendo leches fermentadas, yogures y quesos

- Ácidos orgánicos tales como láctico, cítrico, y ácidos acéticos
- Los aminoácidos lisina y ácido glutámico
- Vitaminas A, C, B₁₂, y riboflavina .

2. PULQUE

La cultura gastronómica de México incluye una bebida conocida como "pulque", una bebida de consistencia espesa, de color lechoso y con un contenido de 3 a 4% de alcohol. En náhuatl su nombre es *octli*, que significa "jugo del maguey", el término pulque lo introdujeron los españoles refiriéndose a que era fermentado.

El pulque es obtenido a partir de la fermentación natural de la savia (aguamiel) extraída de diferentes especies de magueyes (*Agave americana*, *A. ferox*, *A. atrocensis*, *A. salmiana* var *salmaiana*, *A. atrovirens* y *A. mapisaga*). Para su producción, el aguamiel recién extraído es transportado en barriles de madera o en bolsas hechas de pieles de cabra y transferido en grandes barricas donde la fermentación se lleva a cabo. Se ha propuesto que el proceso de fermentación comienza en el maguey, donde microorganismos autóctonos como levaduras, bacterias lácticas, bacterias productoras de etanol y bacterias productoras de exopolisacáridos fermentan de manera natural los carbohidratos presentes en el aguamiel. Sin embargo, el proceso se acelera por la adición de aguamiel fresco a un lote de pulque previamente fermentado. El tiempo de fermentación varía desde unas pocas horas hasta toda la noche, dependiendo si la savia se recoge al amanecer o al atardecer. Tradicionalmente, el desarrollo de la viscosidad debida a la síntesis de exopolisacáridos (EPS) es considerado como un criterio para determinar el grado de fermentación (pulque fresco o maduro). El producto final se coloca en barriles de madera y se distribuye para la venta y el consumo, sin la adición de ningún conservante. Todo el proceso se realiza en condiciones no asépticas, por lo tanto, la mezcla de microorganismos involucrados en el proceso de fermentación son las que se producen naturalmente en aguamiel y los incorporados durante su recogida, transporte, la inoculación y la manipulación (Escalante et al., 2004).

2.1 MICROORGANISMOS PRESENTES DURANTE LA FERMENTACIÓN DEL PULQUE

Durante la producción de pulque ocurren tres tipos de fermentaciones: ácida, alcohólica y viscosa; lo que hace de esta bebida un ambiente interesante donde los microorganismos o genes con potencial biotecnológico, tales como los que codifican para transportadores de azúcares, enzimas hidrolíticas, EPS, o aquellos genes de las vías fermentativas involucrados en la producción de ácido láctico o etanol, podrían ser aislados.

Se han determinado importantes cambios en la diversidad microbiana durante la fermentación del aguamiel hasta el producto fermentado final. En la Fig. 1 se muestran los microorganismos identificados por medio del análisis de las secuencias de los ADNr 16S tanto de aguamiel como en muestras de pulque. Estos análisis revelaron que las especies más abundantes en aguamiel son las BAL *L. mesenteroides*, *L. kimchi* y *L. citreum* (Escalante et al., 2008).

La inoculación de pulque fermentado previamente con aguamiel, añade nuevas especies de bacterias al sistema y un contenido importante de levaduras. Después de la inoculación, los microorganismos más abundantes detectados fueron *L. acidophilus*, y la γ -Proteobacteria *Enterobacter agglomerans*.

El proceso de fermentación se inicia en un ambiente ácido (pH = 3.8) y rico en azúcar, con una diversidad bacteriana compleja compuesta tanto por bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Fig 1) a partir de la cual las bacterias heterofermentativas *L. citreum*, *L. mesenteroides* y *L. kimchi* fueron las especies más abundantes durante la primera hora de fermentación. Después de 3 h de fermentación se observan cambios importantes en la diversidad bacteriana. *Lactobacillus* sp, *L. mesenteroides* y *Enterococcus agglomerans* se convierten en las especies bacterianas dominantes. Otras bacterias como *Zymomonas mobilis*,

Acetobacter malorum y *Acinetobacter radioresistens* se encontraron relativamente constante desde la inoculación.

Al final del proceso de fermentación (6h), la diversidad bacteriana observada se compone principalmente *L. acidophilus*, así como de las BAL heterofermentativas *L. mesenteroides* (50 %), *L. lactis* subsp *lactis* (12,5 %), *Lactobacillus* spp. homofermentativos (14,8 %) y la α -Proteobacteria *A. malorum* (13,6%).

L. acidophilus fermenta la glucosa, fructosa, sacarosa y produce ácido láctico. *Z. mobilis* subsp. *pomaceae* y especies de *Citrobacter* contribuyeron a la producción de ácido láctico, CO₂ , etanol y pequeñas cantidades de ácido acético que son importantes para las características sensoriales del pulque fermentado.

Se ha reportado que algunas especies de BAL son capaces de crecer en ambientes con concentraciones de etanol de hasta el 20 %, por lo tanto, la capacidad de las BAL para resistir altas concentraciones de etanol y su capacidad de crecer en ambientes ácidos (pH 4,5) podría explicar su abundancia relativa durante el proceso de fermentación. Es posible que las especies bacterianas que aparentemente desaparecieron durante la fermentación no fueron capaces de resistir a la acidificación del medio ambiente, el aumento de la concentración de etanol, el posible efecto antimicrobiano de las BAL, tales como la producción de H₂O₂, u otras actividades antimicrobianas (Escalante et al., 2008). Una de las principales propiedades distintivas de pulque es su consistencia viscosa, que es dependiente de la producción de EPS. El principal microorganismo asociado con esta propiedad ha sido *L. mesenteroides*, ampliamente estudiado por su capacidad de producir dextranas (Escalante et al., 2008).

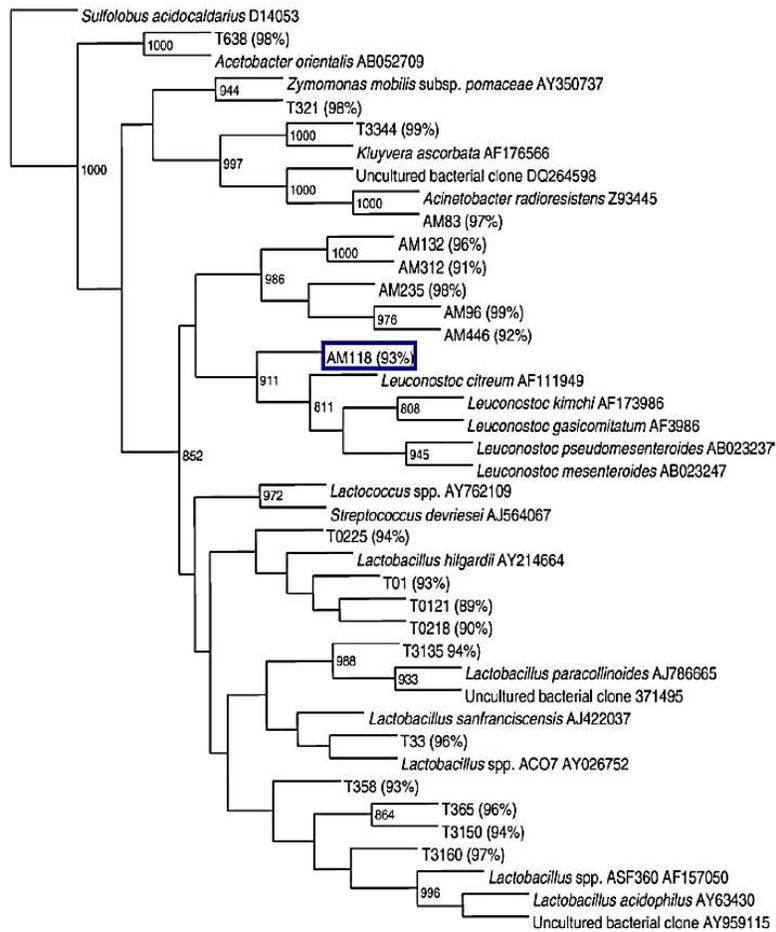


Fig 1. Árbol filogenético de las secuencias de los ADNr 16S detectadas en muestras de aguamiel, pulque y bacterias de referencia obtenidas de la base de datos del NCBI. Además se indica el número de acceso de GenBank más cercano). En el cuadro se señala la muestra de aguamiel (AM118) con un 93% de identidad con *Leuconostoc mesenteroides* (Escalante et al., 2008).

2.2 USOS DEL MAGUEY

El maguey, forma parte importante del paisaje mexicano, y proporciona muchos productos de gran utilidad, entre ellos fabricación de ropa y utensilios con fibras de hojas de *Agave fourcroydes*, *A. sisalana* (henequén), *A. lechuguilla* y *A. salmiana* (Cruz et al., 2006), las pencas que se emplean como platos, tapas, embudos, canales y para techar las casas, de ellas se obtiene la fibra para tejer; sus púas se utilizan como agujas y perforadores; del *A. salmiana* y *A. atrovirens* se obtiene el aguamiel. También tiene propiedades medicinales y sus cenizas sirven como

abono y repelente para plagas. Prospera principalmente en los estados centrales del País (Querétaro, Estado de México, Tlaxcala, Hidalgo, Morelos, D.F y Puebla).

2.3 POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DEL AGAVE

Estudios sobre los componentes de la planta demostraron que *A. salmiana* produce altos niveles de varios terpenos tales como, felandreno, terpineno, p-cimene, limoneno, naftaleno, linalol, 4-terpineol, trans-nerolidol y geraniol, además de contener altos niveles de saponinas (Cruz et al., 2006). Además de contener fructanos de cadena corta que pueden ser utilizados como prebióticos, debido a que estimulan el crecimiento de bacterias benéficas como bifidobacterias (*B. breve*) y lactobacilos al no ser hidrolizados por el estómago y el intestino delgado e inhiben la colonización del intestino por patógenos, ejerciendo un efecto protector hacia los desórdenes intestinales agudos o crónicos. La fermentación de los estos fructanos puede promover algunas funciones fisiológicas específicas a través de la liberación de metabolitos de las bacterias en especial los ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato, butirato, lactato, etc.) al lumen intestinal. Los ácidos grasos de cadena corta actúan mediante la modificación del pH sobre las células intestinales y pueden participar en el control de varios procesos como la proliferación mucosal, la inflamación, la carcinogénesis colorrectal, la absorción de minerales y la eliminación de compuestos nitrogenados (Del Moral Marti et al., 2003).

3. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS (BAL)

Las BAL son un grupo de bacterias Gram-positivas, no formadoras de esporas, con una morfología de cocos o bacilos, que producen ácido láctico como el principal producto final de la fermentación de los diversos carbohidratos. El término BAL está íntimamente asociado con bacterias implicadas en la fermentación de alimentos y con bacterias que se asocian con las superficies de las mucosas de los seres humanos y animales. Los límites del grupo han sido objeto de cierta controversia, pero históricamente los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* forman el núcleo del grupo (Fig 2), sin

embargo, las BAL comprenden alrededor de 20 géneros entre ellos: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Axelsson et al., 2004).

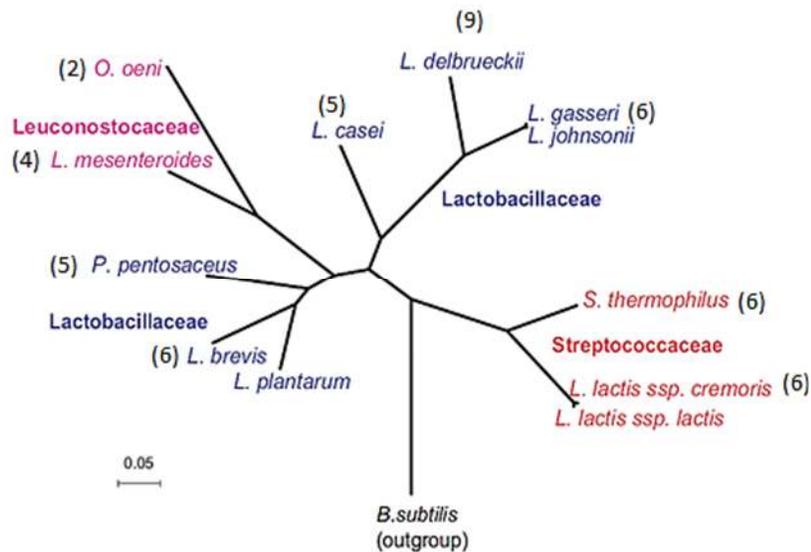


Fig 2. Árbol filogenético de *Lactobacillales* construidos sobre la base de alineaciones concatenadas de ADNr 16S. Las especies son de color de acuerdo a la taxonomía actual: *Lactobacillaceae*, azul; *Leuconostocaceae*, magenta; *Streptococcaceae*, rojo. Entre paréntesis se indica el número de operones de rRNA (Makarova and Koonin, 2007).

Las BAL también se diferencian en el número de operones rRNA, desde dos presentes en *Oenococcus oeni* a nueve en *L. delbrueckii*, que se correlaciona con el número de genes tRNA (Tabla 1) y puede reflejar diferencias en la competitividad ecológica (por ejemplo, capacidad de crecimiento rápido y la producción de ácido láctico) entre estas bacterias. Las BAL presentan plásmidos que son esenciales para el crecimiento en entornos específicos ya que codifican para la producción de bacteriocinas (Makarova and Koonin, 2007).

Tabla 1. Características generales del genoma de BAL (Makarova and Koonin, 2007).

Especies	No. de operones de rRNA	No. de tRNAs	No. de proteínas	Tamaño del genoma (bp)	%ORFS relacionados con transposones
<i>Oenococcus oeni</i>	2	43	1,701	1,780,517	0.54
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	4	71	2,009	2,075,763	0.51
<i>Lactobacillus casei</i>	5	59	2,776	2,924,325	3.25
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	5	55	1,757	1,832,387	0.24
<i>L. gasserii</i>	6	78	1,763	1,894,360	0.18
<i>L. brevis</i>	6	65	2,221	2,340,228	1.4
<i>Lactococcus lactis</i> sp. <i>Cremonis</i>	6	62	2,509	2,641,635	4.82
<i>Streptococcus thermophilus</i>	6	67	1,718	1,864,178	3.72
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	9	98	1,725	1,856,951	1.93

OFR : Open Reading Frame (Marco de Lectura Abierto)

3.1 COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR BAL

El efecto antimicrobiano primario de esta clase de bacterias se produce por la competencia de nutrientes y al descenso del pH, debido a la producción de ácidos orgánicos. Además se producen otras sustancias antimicrobianas como etanol, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas

3.1.1 ÁCIDOS ORGÁNICOS

El ácido láctico producido interactúa con las membranas celulares y causa acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde a un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias (Salminen et al., 2004).

El ácido acético y propiónico producidos por las cepas de BAL por la vía heterofermentativa, interactúan con las membranas celulares y causan acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas. Estos compuestos antimicrobianos son más efectivos que el ácido láctico debido a los elevados valores de pKa (ácido láctico 3.08, ácido propiónico 4.87 y ácido acético 4.75), por lo tanto tienen un mayor rango de actividad antimicrobiana contra levaduras, mohos y bacterias (Yang, 2000)

El ácido acético es más efectivo contra el crecimiento de *Listeria monocytogenes* que el ácido láctico y ácido cítrico. El ácido acético tiene una actividad sinérgica con el ácido láctico; el pH del medio disminuye por la acción del ácido láctico, aumentando la toxicidad del ácido acético (Yang et al., 2000).

3.1.2 PEROXIDO DE HIDRÓGENO Y OTROS METABOLITOS DEL OXÍGENO

En condiciones aeróbicas, las BAL transforman el oxígeno molecular (O₂) en metabolitos del oxígeno como anión superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y radical hidroxilo (HO⁻); estas reacciones son catalizadas por enzimas específicas generalmente en presencia de un sustrato a oxidar (Leveau y Bouix, 2000). El conjunto de las enzimas y sus derivados así como las reacciones catalizadas aparecen en la Tabla 2, estas enzimas han sido halladas en cepas de *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*.

Estos metabolitos tienen un efecto antimicrobiano contra otros microorganismos, incluidos los patógenos presentes en alimentos, esto principalmente por la inactivación de enzimas como: gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa, lactato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa o coenzima A y por la oxidación de los grupos sulfhidrilo. La inhibición también es causada por el aumento de la permeabilidad de las membranas debido a la peroxidación de lípidos y daño en el material genético.

Tabla 2. Enzimas del metabolismo del oxígeno y sus derivados (Leveau y Bouix, 2000).

(NADH: H₂O₂ oxidasa)
$NADH + H^+ + O_2 \longrightarrow NAD^+ + H_2O^+$
(NADH: H₂O₂ oxidasa)
$2 NADH + 2 H^+ + O_2 \longrightarrow 2 NAD^+ + 2 H_2O$
Piruvato oxidasa (+ TPP, FAD)
$Piruvato + Fosfato + O_2 \longrightarrow Acetilfosfato + CO_2 + H_2O_2$
(α-glicerofosfato oxidasa)
$\alpha\text{-glicerofosfato} + O_2 \longrightarrow Dihidroxiacetona\ fosfato + H_2O$
(Superóxido dismutasa)
$2 O_2^- + 2 H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$
(NADH peroxidasa)
$NADH + H^+ + H_2O_2 \longrightarrow 2 H_2O + NAD^+$

TPP: tiamina pirofosfato; FAD: flavina adenina dinucleótido

EFFECTO BACTERIOSTÁTICO DE LOS METABOLITOS DE OXÍGENO

Las bacterias homofermentativas catabolizan la glucosa a través de la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), mientras que las bacterias heterofermentativas siguen la vía de las pentosas fosfato. En la homofermentación, las 2 moléculas de NADH durante la formación del Gliceraldehído-3-fosfato (G3P) se vuelven a oxidar para favorecer la reducción del piruvato a ácido láctico por una deshidrogenasa láctica (LDH). Cuando las células están en condiciones aeróbicas, su sistemas NADH peroxidasa y NADH oxidasa se inducen, los cuales compiten con la LDH por el NADH disponible. Esto se traduce en una disminución en la actividad acidificante de las bacterias.

La oxidación de compuestos de sulfhidrilo puede tener un efecto bacteriostático o bactericida, en función de si o no la reacción es reversible cuando las células vuelven a condiciones anaeróbicas. El efecto desnaturalizante de oxígeno y sus metabolitos en G3P deshidrogenasa se ha demostrado y es probable que la oxidación de sulfhidrilo a disulfuro afecta a un número de enzimas (deshidrogenasa láctica, alcohol deshidrogenasa) o coenzimas con grupos sulfhidrilo (coenzima A) (Piard et al., 1991).

EFFECTO BACTERICIDA DE LOS METABOLITOS DE OXÍGENO

Los radicales libres y peróxido de hidrógeno dañan los ácidos nucleicos bacterianos, lo que conduce a alteraciones reversibles o irreversibles. Ananthaswamy, (2004) demostró la modificación de ADN debida al H_2O_2 , al mostrar que mutantes de *E coli* que carecen de los sistemas de reparación del ADN fueron más sensibles a H_2O_2 que las cepas con los sistemas de reparación intactos. El H_2O_2 provoca roturas en la estructura del ADN, liberando los nucleótidos y previniendo la replicación de cromosomas. El radical hidroxilo puede atacar el grupo metilo de la timina, dañando de ese modo el ADN. El oxígeno molecular activo también puede reaccionar con la guanina y provocar rupturas en una cadena de ADN (Piard et al., 1991).

3.1.3 DIÓXIDO DE CARBONO

Como consecuencia de un proceso heterofermentativo de los carbohidratos, las BAL producen dióxido de carbono, que puede crear condiciones anaeróbicas e inhibir el crecimiento de microorganismos aerobios obligados o formar ácido carbónico y causar un descenso de pH (Salminen et al.,2004).

3.1.4 COMPUESTOS AROMÁTICOS

El diacelilo se sintetiza en la vía de degradación del piruvato, es producido por cepas de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* así como otros microorganismos por la fermentación del citrato, liberándose al medio extracelular. Su acción antimicrobiana es bactericida para las bacterias Gram-negativas y bacteriostática para las Gram-positivas, debido al grupo α -dicarbonil de la molécula, que reacciona con la porción guanido del aminoácido arginina de las enzimas microbianas, desactivándolas por bloqueo o modificación de la zona catalítica (De Vuyst et al., 1994).

3.1.5 COMPUESTOS INHIBITORIOS DE BAJO PESO MOLECULAR

Estos componentes comparten la característica de ser activos a bajo pH, son termoestables, tienen un espectro amplio de actividad y son solubles en acetona (Ouwehand et al., 1999).

La **reuterina** (74 Da) es una sustancia antimicrobiana producida por cepas de *Lactobacillus reuteri*, dentro de los organismos importantes en la salud pública que son sensibles a la reuterina se encuentran especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida* y *Tripanosoma* (Yango et al., 2000).

El **ácido piroglutámico** con peso molecular <1000 Da, es producido por *L. casei* subsp. *casei*, *L. casei* subsp. *pseudoplantarum* y *Streptococcus bovis*. Es capaz de inhibir a bacterias como *Bacillus subtilis*, *Enterobacter colacae* y *Pseudomonas putida* (Ouwehand et al., 1999).

3.1.6 SUSTANCIAS INHIBITORIAS BLIS (BACTERIOCIN-LIKE INHIBITORY SUBSTANCES, POR SIS SIGLÁS EN INGLÉS)

Son sustancias antimicrobianas de naturaleza proteínica, las cuales no están completamente definidas o cumplen con los criterios de la definición de bacteriocinas. Por lo general tienen un espectro más amplio de actividad que las propias bacteriocinas, ya que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos y levaduras (Atanassova et al., 2003).

3.1.7 PEPTIDO GLUCANO HIDROLASA (PGH)

Las péptido glucano hidrolasas (PGH) representan un amplio grupo de enzimas de diferente origen, pero con una estructura similar. Su sustrato es el peptidoglicano, el componente más importante de las paredes celulares bacterianas. La actividad de estas enzimas resulta en una perturbación de la pared celular y la consiguiente lisis celular bacteriana. Las bacterias Gram-positivas son un grupo de acción apropiado para las PGH, ya que estas poseen una capa de peptidoglicano que sirve como primera línea de defensa de la integridad celular (Mendez et al., 2010).

De acuerdo a la especificidad de hidrólisis de los enlaces, las PGH se pueden dividir en varios grupos, como se muestra en la Figura 3. La especificidad de la hendidura depende del dominio catalítico de la PGH:

- **Glicosidasas (N-acetilglucosaminidasas y N-acetylmuramidasas).** Hidrolizan los enlaces β -(1→4) entre unidades disacáridas de cadenas de glucano.
- **Peptidasas** son capaces de escindir los péptidos cortos (carboxipeptidasas) o puentes de péptidos cruzados (endopeptidasas).
- **N-acetylmuramoyl-L-alanina-amidasas (amidasas).** Escinden el enlace amida entre las cadenas de glucanos y puentes peptídicos.

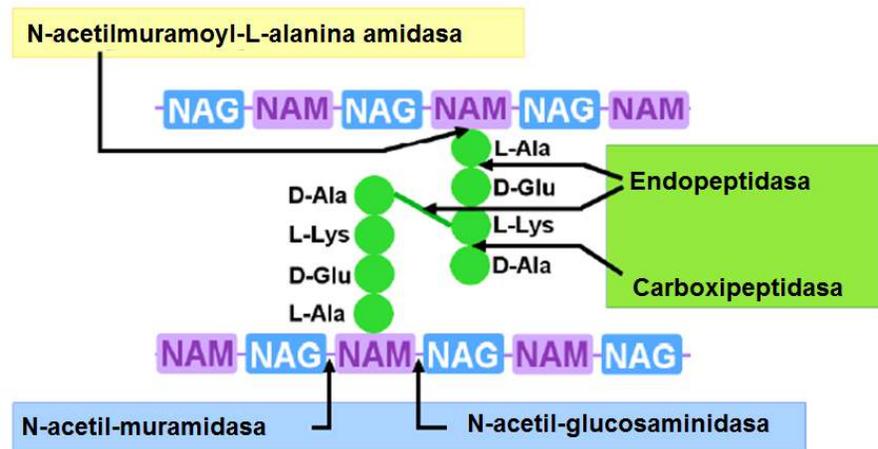


Fig 3. Estructura del peptidoglucano y especificidad de hidrólisis de enlaces de las peptidoglucano hidrolasas (Mendez et al., 2010).

4. BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos de bajo peso molecular, sintetizadas en los ribosomas, estables al calor, producidas por bacterias y son activas contra otras bacterias, en ocasiones de la misma especie (espectro reducido), o de diferente género (de amplio espectro) (Cotter et al., 2005). El interés por las mismas deriva del hecho de que son producidas por organismos que se encuentran en los alimentos y por esta razón podrían ser consideradas como "naturales" (Ouwehand et al., 1999).

Las bacteriocinas difieren en su espectro de actividad, características bioquímicas y determinantes genéticos. La mayoría de las bacteriocinas son pequeñas generalmente de 3-10 kDa, tienen un punto isoeléctrico alto y contienen dominios hidrofóbicos e hidrofílicos (Ouwehand et al., 1999).

Las bacteriocinas de las BAL tienen muchas características que las hacen candidatas adecuadas para su uso como conservantes de alimentos, tales como:

- La naturaleza de proteínas, la inactivación por enzimas proteolíticas del tracto gastrointestinal

- No son tóxicas
- Inactivas contra las células eucariotas
- Por lo general son termorresistentes (puede mantener la actividad antimicrobiana después de la pasteurización y esterilización)
- La actividad bactericida de amplio que afecta a la mayoría de las bacterias Gram-positivas y algunas bacterias Gram-negativas incluyendo diversos patógenos, tales como *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, y *Salmonella* (Oscáriz et al., 2001).

El Orden de *Lactobacillales* hace referencia a bacterias Gram-positivas productoras de péptidos antimicrobianos específicos producidos ribosomalmente y denominados bacteriocinas, debido a que son proteínas pequeñas con secuencias muy divergentes, a menudo son difíciles de identificar por análisis de su secuencia de aminoácidos conservados.

Entre los genomas de organismos pertenecientes al Orden *Lactobacillales* analizados por Makarova et al., siete de ellos poseen agrupaciones de genes de bacteriocinas (putativos) y proteínas asociadas. Dentro de estas regiones, se identificaron dos familias de prebacteriocinas:

- Una familia consta de precursores de una bacteriocina conocida como pediocina de *P. pentosaceus*, homólogos de que también están presentes en *L. mesenteroides* y *L. casei*.
- La segunda familia consiste en bacteriocinas (putativas) relacionadas a la Divercina V41 y presentes en *P. pentosaceus* y *L. Johnsonii* (Makarova et al., 2007).

Además, numerosos marcos de lectura abiertos situados en la proximidad inmediata de los genes putativos para bacteriocinas y proteínas asociadas pueden codificar nuevos péptidos. Los genes que codifican bacteriocinas se transfieren horizontalmente tal como indica el análisis de los respectivos árboles

filogenéticos y las diferencias en la organización del operón (Makarova et al., 2007).

Un ejemplo de los daños y lisis causados por la enterocina AS-48 (0,1 mg/mL durante 2 h, y/o 3 mg/mL durante 10 min) sobre células de *Listeria monocytogenes* CECT 4032 (Fig 4) se observa cuando (A) las células tratadas muestran una marcada retracción del cuerpo celular, (B) una separación visible desde la pared celular en algunos puntos, donde el citoplasma de las células tratadas tenía una densidad mucho menor (probablemente debido a la pérdida de solutos). También se observaron células vacías (fantasmas), así como las paredes celulares rotas. Además, la acción de la bacteriocina causó la desorganización completa de la membrana celular, con la formación de pequeñas vesículas (C-D).



Fig 4. Ejemplo de los daños causados por bacteriocinas sobre células en fase exponencial de *Listeria monocytogenes* CECT 4032. (A) Células sin enterocina AS-48; (B) Células tratadas con 0.1 µg/ml de enterocina AS-48 durante 2 horas; (C y D) células tratadas con 3 µg/ml de enterocina AS-48 durante 10 min (Adaptado de Mendoza et al., 1999).

4.1 CLASIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS

De acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas, las bacteriocinas producidas por las BAL se han clasificado en cinco clases (Tabla 3):

Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas (Adaptada de Oscáriz et al., 2001).

Subclase	Bacteriocina representativa	Bacteria productora	Características
CLASE I Lantibiótico (<5 kDa)			
Pequeños péptidos catiónicos de membrana formados por residuos de aminoácidos (antionina y β -metil lantionina) modificados postraduccionalmente. La formación de estos enlaces dentro del péptido genera una serie de estructuras "globulares" que son características de los lantibióticos los cuales ejercen su efecto a nivel de la membrana y la pared celular.			
Ia	Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>	Las modificaciones postraduccionales involucran reacciones de deshidratación de residuos de serina y treonina, lo que da lugar a la formación de dehidroalanina (Dha) y dehidrobutirina (Dhb) respectivamente. La reacción de estos aminoácidos con el grupo tiol (SH) de un residuo de cisteína, genera un enlace tioéter generando lantionina (en el caso de Dha) y β -metil-lantionina (en el caso de Dhb).
	Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
Ib	Mersacidina	<i>Bacillus</i> sp.	
	Mutacina	<i>Streptococcus mutans</i>	
CLASE II No-Lantibiótico (<10 kDa)			
Son péptidos de bajo peso molecular, termoestables, formados únicamente por aminoácidos modificados (no contienen lantionina), sintetizados en el ribosoma como péptidos inactivos y entran en función por el corte post-traducción en el N-terminal del péptido líder e inducen la formación de poros en la membrana de las células blanco.			
IIa	Leucocina A	<i>Leuconostoc gelidum</i>	Péptidos simples anti-listeria que contienen la secuencia de aminoácidos YGNGV cerca del N-terminal.
	Pediocina PA-1	<i>Lactococcus lactis</i>	
	Mesentericina Y105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	Sakacina P	<i>Lactobacillus sakei</i>	

Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas (Adaptada de Oscáriz et al., 2001) (continuación)

Subclase	Bacteriocina representativa	Bacteria productora	Características
CLASE II Lantibiótico (<5 kDa)			
IIb	Lactococcina G Lactococcina A Lactacina F Plantaricinas	<i>L. lactis</i> <i>L. lactis sub cremoris</i> <i>L. jhonsonii</i> <i>L. plantarum</i>	Bacteriocinas de dos péptidos
IIc	Enterocina AS-48 Divergicina A	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Carnobacterium divergens</i>	Péptidos thiol activados (necesitan reducir la cisteína para su actividad).
CLASE III (>30 kDa)			
Peptidos grandes termilábiles	Helveticina J Lactacinas A y B	<i>L. helveticus</i> <i>L. jhonsoni</i>	La mayoría son producidos por el género <i>Lactobacillus</i>
CLASE IV			
Bacteriocinas complejas	Lactocina 27 Pediocina SJ-1	<i>L. curvatus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Son proteínas con lípidos y/o carbohidratos
CLASE IV			
Bacteriocinas complejas	Lactocina 27 Pediocina SJ-1	<i>L. curvatus</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Son proteínas con lípidos y/o carbohidratos
CLASE V			
Bacteriocinas circulares	Enterocina AS-48	<i>Enterococcus faecalis</i>	Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente.

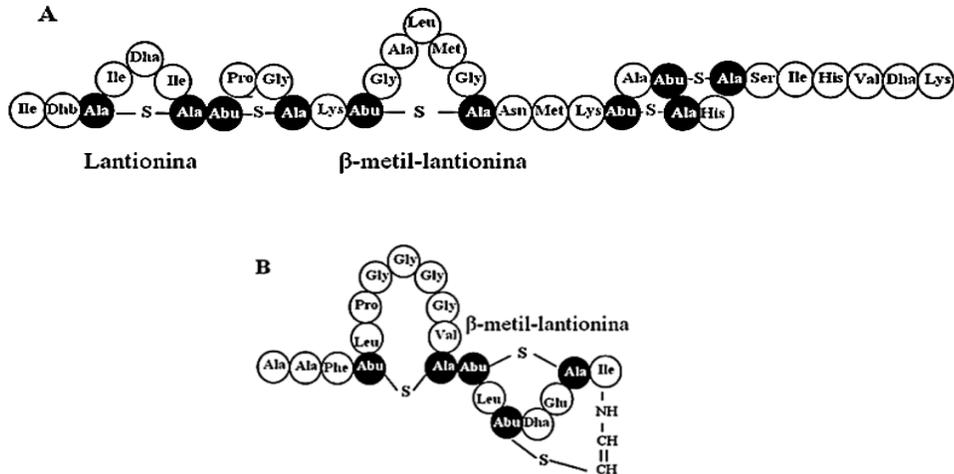


Fig 5. Estructura del lantibiótico (A) nisina y (B) mersacidina. Los residuos de lantionina se indican en negro y como Ala-S-Ala. Los residuos de β -metil-lantionina se muestran en negro y como Abu-S-Ala (López et al., 2008).

4.2 MODO DE ACCIÓN DE LAS BACTERIOCINAS

La acción de las bacteriocinas está determinada por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente se considera también en la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria (Cintas et al., 2001).

Se ha determinado que las bacteriocinas demuestran alta actividad bactericida que se relaciona principalmente con el contenido de cistina; y de acuerdo a ello, se establecen tres espectros de acción:

- a) Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie.
- b) Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, bacterias Gram-positivas y patógenas presentes en alimentos.
- c) Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición que actúan contra un gran número de bacterias Gram-positivas

La mayoría de las investigaciones han demostrado que la actividad bactericida de las bacteriocinas, se dirige principalmente contra bacterias Gram positivas. Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas que presentan un amplio rango de acción, inhibiendo especies Gram-negativas (Mota-Meira et al., 2001; Chung et al., 2005) hongos patógenos y virus.

Cotter et al., determinaron que las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas presentan diferentes modos de acción de acuerdo a su clasificación (Fig. 6)

4.2.1 CLASE I- LANTIBIÓTICOS

El modo de acción de los lantibióticos se atribuye a la desestabilización (debido a la formación de poros) de las funciones de la membrana citoplasmática. La estructura de estos péptidos, α -hélice o β -laminar, pueden formar dos caras, una hidrofílica y otra hidrofóbica creando oligómeros que pueden atravesar la membrana y formando poros. El lado apolar de la molécula se situará próxima a los lípidos de la membrana y el lado polar al centro del poro.

Como consecuencia, se observa una pérdida de iones K^+ , ATP y, en algunos casos aminoácidos y moléculas pequeñas. La pérdida de estas sustancias origina a su vez una pérdida del potencial de la membrana, consumo de las reservas energéticas celulares, descenso de la síntesis de ADN, ARN y proteínas, originando la muerte celular. Algunos miembros de la clase I, como la nisina, poseen el siguiente mecanismo de acción (Fig 6):

- Etapa 1, la nisina posee una carga neta positiva que incrementa su interacción con las cargas negativas de los componentes de la pared celular como lipopolisacáridos de la membrana de las bacterias Gram-negativas, o con los ácidos teicoicos y lipoteicoicos de la pared de las bacterias Gram-positivas; la hidrofobicidad es una característica requerida para la inserción de la bacteriocina en la membrana celular, y la flexibilidad que le permite a la bacteriocina realizar un cambio conformacional de un estado soluble a uno de interacción con la membrana

- Etapa 2, la nisina se une al lípido II, principal transportador de las subunidades de peptidoglucano del citoplasma a la pared celular interfiriendo con su síntesis, lo que lleva a la bacteria a muerte celular.
- Etapa 3, adicionalmente, varias moléculas de nisina utilizan al lípido II para anclarse e insertarse en la membrana celular y comenzar con la formación de los poros, lo que lleva a la bacteria a una rápida muerte celular (López et al., 2008)

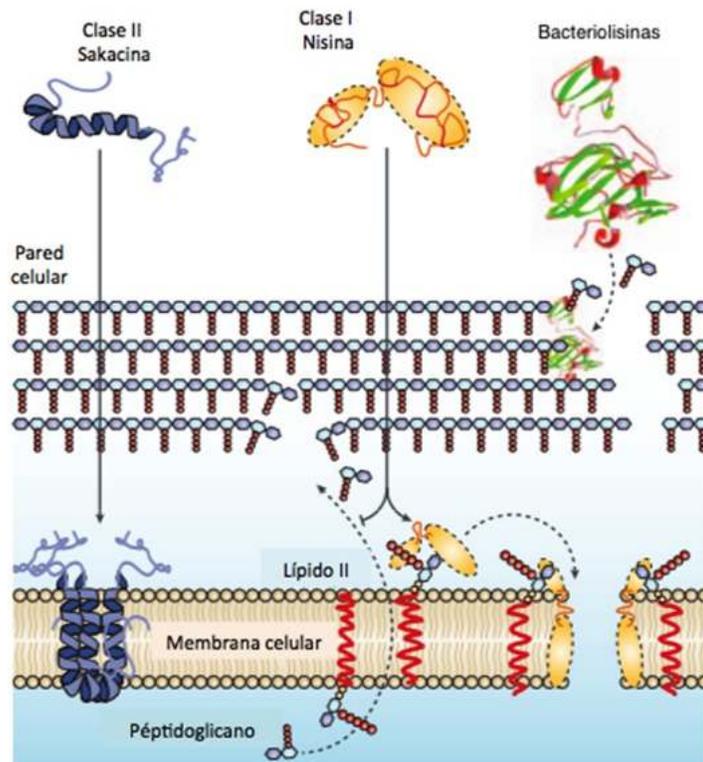


Fig 6. Modelo que muestra el mecanismo de acción de las bacteriocinas clase I y II (Cotter et al., 2005).

4.2.2 CLASE II- NO LANTIBIÓTICOS

La mayoría de las bacteriocinas de clase II inhiben el crecimiento de bacterias similares mediante las interacciones con la membrana celular que inicia con el reconocimiento entre la bacteriocina y el receptor de la membrana celular, seguido de una serie de interacciones electrostáticas, que le permite insertarse dentro de la membrana interfiriendo con su estructura y conduciendo a una despolarización, la muerte y la lisis de la célula diana (Cotter et al., 2005).

4.3 SÍNTESIS DE BACTERIOCINAS CLASE II

1. La proteína histidina cinasa (HPK) detecta la presencia del Factor de Inducción (IF) y se autofosforila. (Fig 7)
2. El grupo fosfato es transferido al Regulador de Respuesta (RR), el cual activa los genes involucrados en la síntesis de la pre-bacteriocina (pre-enterocina A).
3. La pre-bacteriocina contiene un péptido señal en la región N-terminal y un sitio de procesamiento proteolítico de doble glicina (en contraste con los antibióticos, que no se someten a una amplia modificación postraduccional). El péptido señal mantiene a la bacteriocina en forma inactiva dentro de la célula productora facilitando su interacción con el transportador, y en el caso de los antibióticos juega un papel importante en el reconocimiento de la pre-bacteriocina por las enzimas que realizan las modificaciones postraduccionales.
4. El pre-péptido y el IF son transportados al exterior por el transportador membranal ABC (dependientes de ATP) y la Proteína auxiliar; AP, removiendo proteolíticamente el péptido señal.
5. De esta manera el extremo carboxilo terminal es separado del péptido señal y es liberado al espacio extra celular representando al péptido biológicamente activo y al IF.
6. La proteína de inmunidad protege a la bacteria productora de la acción de sus propios péptidos. Se han propuesto dos sistemas de protección: (i) La protección puede ser proporcionada por una proteína específica que secuestra e inactiva a la bacteriocina, o bien se une al receptor de la bacteriocina cambiando su estructura conformacional haciéndolo inaccesible a esta última (ii) . El segundo sistema lo constituyen las proteínas de transporte ABC, que en algunos casos proporcionan el mecanismo de protección mediante la expulsión de las bacteriocinas que se unen a la membrana.

Un esquema general de la ruta biosintética de las bacteriocinas clase II se muestra

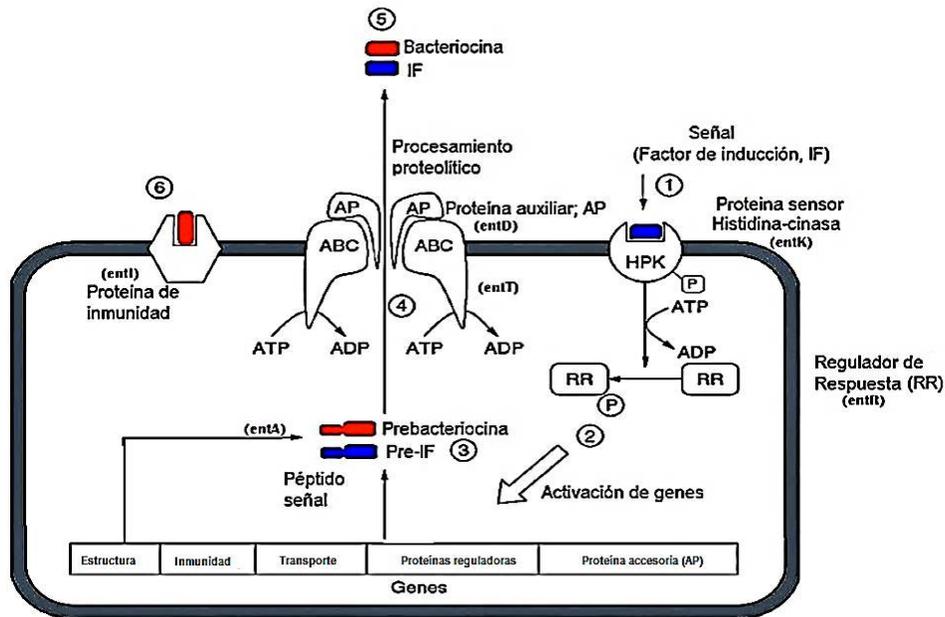


Fig 7. Regulación de la síntesis de la enterocina A de *Enterococcus faecium* (no antibiótico) (Petre et al., 2012).

4.4 ORGANIZACIÓN GENÉTICA DE LAS BACTERIOCINAS

Los genes que codifican bacteriocinas están organizados como operones. Varias proteínas responsables de la modificación y exportación de bacteriocinas y regulación de la biosíntesis de estas, son a menudo codificadas en el mismo operón. Así por ejemplo, el operón de la enterocina A (no antibiótico) (Fig 8) de *Enterococcus faecium* contiene los genes (*ent AIFKRTD*) que codifican:

- La pre-enterocina.
- La proteína involucrada en la autoprotección de la cepa productora.
- El gen de inducción de la síntesis de la bacteriocina.
- Los genes de las proteínas involucradas en su transporte extracelular
- Los genes de las proteínas involucradas en la regulación de la síntesis de la bacteriocina. En el caso de los antibióticos, estos poseen adicionalmente los genes que codifican las enzimas de modificación de la bacteriocina (López et al., 2008).

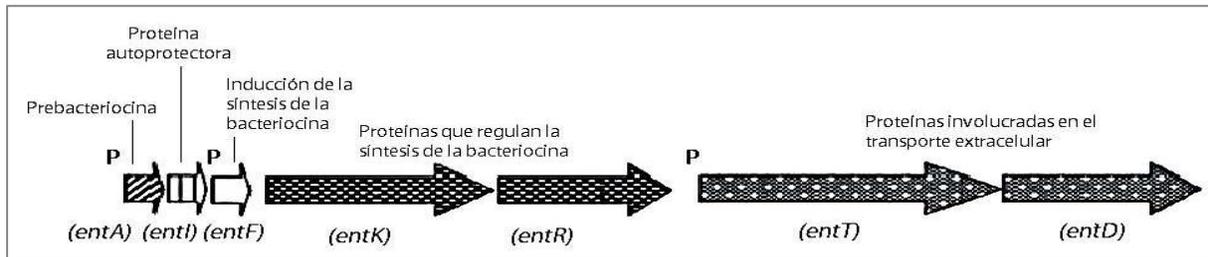


Fig 8. Organización genética de los operones de la enterocina A de *Enterococcus faecium* (no lantibiótico). Genes con funciones similares se muestran con la misma trama. P=Regiones promotoras (López et al., 2008).

La regulación de la síntesis de las bacteriocinas está mediada por sistemas de transducción, entre los factores que activan estos sistemas incluyen, la presencia de otra bacteria competidora, estrés por temperatura y un mecanismo de “censado poblacional” o “*quorum sensing*” (López et al., 2008).

Además, numerosos marcos de lectura abierta pequeños situados en la proximidad inmediata de los genes de bacteriocinas y proteínas asociadas pueden codificar nuevas bacteriocinas y Proteínas de Inmunidad (Fig 9) a pesar de la falta de similitud con secuencias conocidas (Makarova and Koonin, 2007).

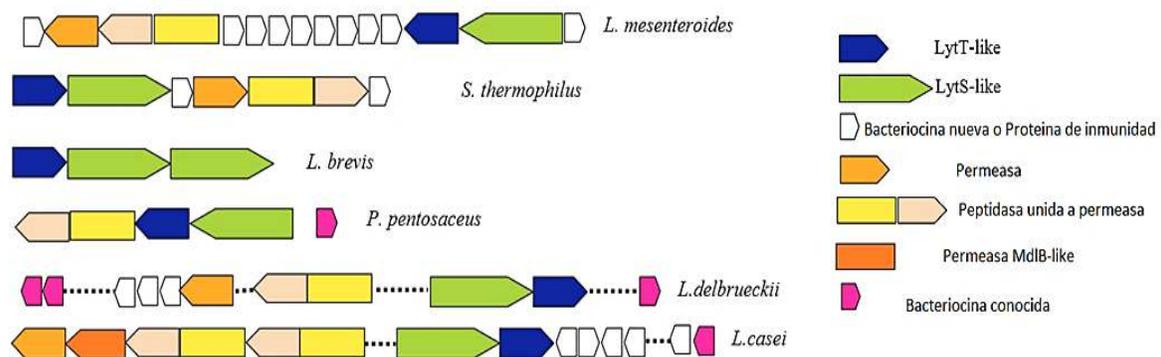


Fig 9. Cluster de genes que codifican tanto para bacteriocinas conocidas y previstas como para el sistema de transporte de bacteriocinas (Makarova and Koonin, 2007).

5. FERMENTACIÓN

Bioquímicamente, la fermentación es el proceso metabólico en el que los carbohidratos y compuestos relacionados se oxidan parcialmente en la ausencia de cualquier aceptor de electrones externos, con la liberación de una pequeña cantidad de energía y con productos que constan de algunos compuestos orgánicos que son más reducidos que otros (Bosscher et al., 2009). Los alimentos fermentados albergan diversos microorganismos como mohos, levaduras, y bacterias los cuales transforman los componentes químicos de las materias primas durante la fermentación de alimentos, mejorando el valor nutritivo de los productos. Las BAL son industrialmente organismos importantes reconocidos por su capacidad fermentativa (Tabla 4), así como sus beneficios para la salud y nutrición.

De acuerdo con los productos finales de la fermentación de la glucosa, las BAL se han dividido en dos grandes grupos: homofermentativas y heterofermentativas. En la tabla 5, se muestran los géneros de bacterias de ácido láctico, su tipo de fermentación y productos. El grupo homofermentativo compuesto por *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*, posee las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa y utilizan la ruta EMP al convertir 1 mol de glucosa en dos moles de ácido láctico, además de producir más del 85% de ácido láctico a partir de la glucosa. En la Figura 10 a se observa que el ácido láctico es el principal producto de esta fermentación. Mientras que las bacterias heterofermentativas compuesto por los géneros: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, estas bacterias contienen la enzima fosfoacetolasa y así que en lugar de seguir la vía EMP, utilizan las vías de la hexosa monofosfato o la de la pentosa fosfato produciendo alrededor de un 50% de ácido láctico, 25% de ácido acético y alcohol etílico y 25% de CO₂ (Fig 10b). Existen también las bacterias heterofermentativas facultativas, las cuales utilizan la vía EMP o la vía de las pentosas fosfatos para dar como productos en su mayoría ácido láctico, ácido acético, CO₂, ácido fórmico y etanol (Tamang et al., 2010).

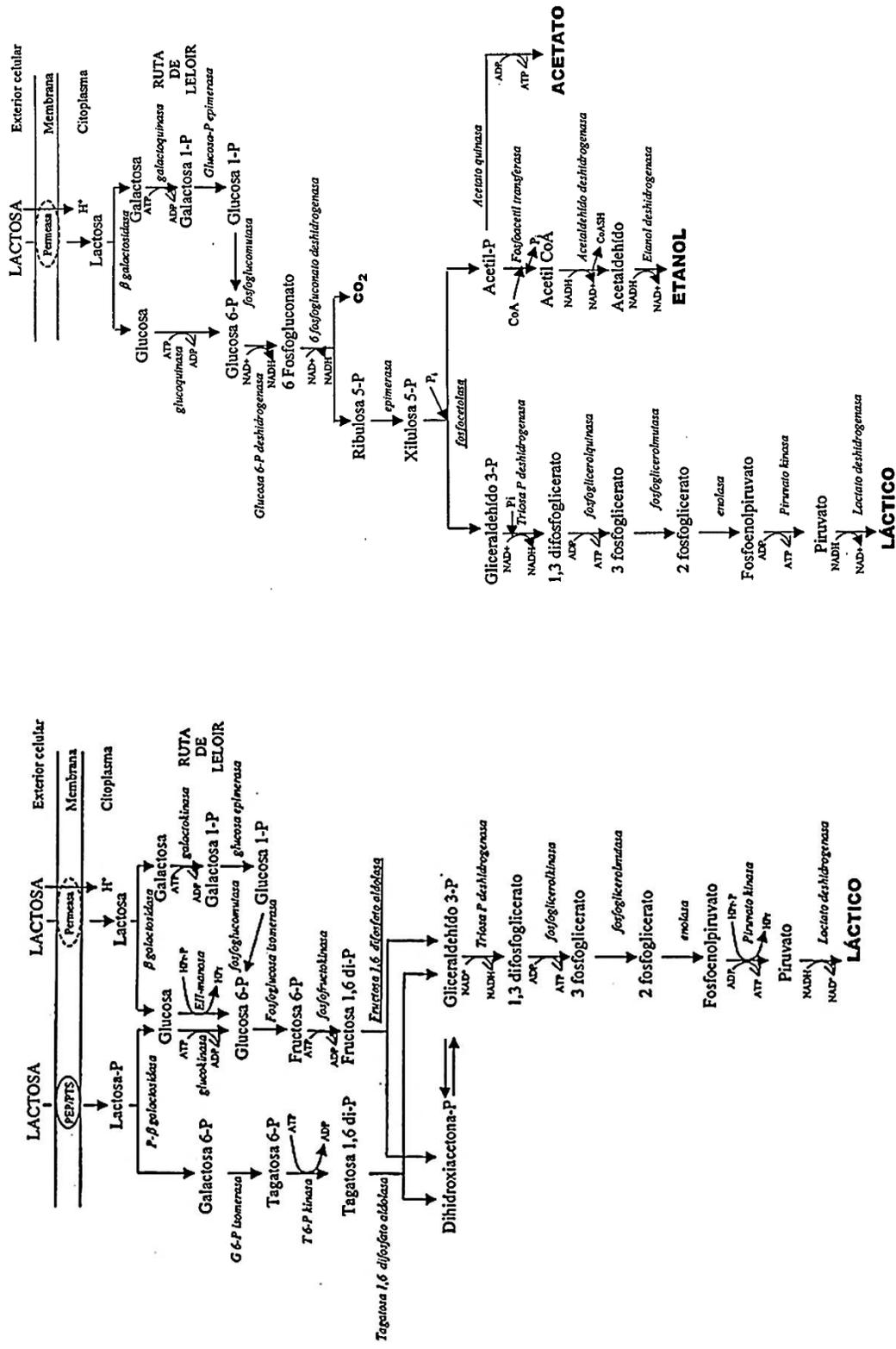


Fig 10. (a) Ruta homofermentativa y **(b)** Ruta heterofermentativa de utilización de lactosa de las bacterias del ácido láctico (Tamang et al., 2010)

Tabla 4. Alimentos y bebidas fermentadas y sus bacterias lácticas asociadas
(Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2010).

Productos fermentados	Bacterias Ácido Lácticas
<p>Productos lácteos</p> <p>-Quesos duros sin ojos</p> <p>-Quesos con ojos pequeños</p> <p>-Quesos de tipo italiano y suizo</p> <p>-Mantequilla y el suero de leche</p> <p>-Yoghurt</p> <p>-Leche fermentada probiótica</p> <p>-Kefir</p>	<p><i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i></p> <p><i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. helveticus</i>, <i>L. casei</i>, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>, <i>S. thermophilus</i></p> <p><i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>, <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>, <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>, <i>S. thermophilus</i> <i>L. casei</i>, <i>L. acidophilus</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. johnsonii</i>, <i>B. lactis</i>, <i>B. bifidum</i>, <i>B. breve</i> <i>L. kefir</i>, <i>L. kefiranofacies</i>, <i>L. brevis</i></p>
<p>Carnes fermentadas</p> <p>Salchicha fermentada (Europa)</p> <p>Salchicha fermentada (EE.UU.)</p>	<p><i>L. sakei</i>, <i>L. curvatus</i></p> <p><i>P. acidilactici</i>, <i>P. pentosaceus</i></p>
<p>Hortalizas fermentadas</p> <p>Sauerkraut</p> <p>Encurtidos</p> <p>Aceitunas fermentadas</p>	<p><i>L. mesenteroides</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>P. acidilactici</i>, <i>L. mesenteroides</i>, <i>P. cerevisiae</i>, <i>L. brevis</i>,</p> <p><i>L. plantarum</i>, <i>L. mesenteroides</i>, <i>L. pentosus</i>, <i>L. plantarum</i></p> <p><i>P. acidilactici</i>, <i>P. pentosaceus</i>, <i>L. plantarum</i></p>
<p>Cereales fermentados</p> <p>Masa fermentada</p>	<p><i>L. sanfransiscensis</i>, <i>L. farciminis</i>, <i>L. fermentum</i>, <i>L. brevis</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. amylovorus</i>, <i>L. reuteri</i>, <i>L. pontis</i>, <i>L. panis</i>, <i>L. alimentarius</i>, <i>Weissella cibaria</i>.</p>
<p>Productos pesqueros fermentados</p>	<p><i>L. alimentarius</i>, <i>C. piscicola</i></p>

Tabla 5. Géneros de BAL, tipo de fermentación y productos (Tamang et al., 2010).

Género (Subgénero)	Tipo de Fermentación	Producto Principal (Relación molar)	Configuración de lactato
<i>Streptococcus</i>	Homofermentativo	Lactato	L (+)
<i>Pediococcus</i>	Homofermentativo	Lactato	DL, L (+)
<i>Lactobacillus</i>	Homofermentativo	Lactato	
<i>Thermobacterium</i>	Homofermentativo	Lactato	D(-), L (+), DL
<i>Streptobacterium</i>	Homofermentativo	Lactato	D(-), L (+), DL
	Heterofermentativo ¹	Lactato:Acetato (1:1)	D (-), L (+), DL
<i>Betabacterium</i>	Heterofermentativo	Lactato:Acetato:CO ₂ (1:1:1)	DL
<i>Leuconostoc</i>	Heterofermentativo	Lactato:Acetato:CO ₂ (1:1:1)	D (-)
<i>Bifidobacterium</i>	Heterofermentativo	Lactato:Acetato (2:3)	L (+)

(1) En caso de fermentación de pentosas fosfato.

6. GENERALIDADES de *Leuconostoc mesenteroides*

El género *Leuconostoc* consta de las siguientes 14 especies: *Leuconostoc mesenteroides*, *L. carnosum*, *L. citreum*, *L. durionis*, *L. fallax*, *L. ficulneum*, *L. fructosum*, *L. gasicomitatum*, *L. gelidum*, *L. inhae*, *L.kimchii*, *L. lactis*, *L. pseudoficulneum* y *L. pseudomesenteroides*, en la Fig 11 se muestra la relaciones filogenéticas de estas especies y los 3 subgrupos (Endo et al., 2008).

Este género comprende bacterias Gram-positivas no esporuladas que se desarrollan en aerobiosis o anaerobiosis. Son BAL que necesitan un medio de crecimiento complejo rico en aminoácidos, péptidos, carbohidratos, vitaminas y iones metálicos. Por lo general son células esféricas semejantes a bacilos muy cortos con extremos redondeados. La especie *L. mesenteroides*, tiene un metabolismo heterofermentativo, produciendo ácido láctico, CO₂, etanol y/o acético como consecuencia de la fermentación de los azúcares. No produce NH₃ a

partir de arginina, lo que junto con la producción de ácido láctico, los diferencia de los lactobacilos heterofermentativos. Se diferencia de otras especies en que esta puede tolerar concentraciones bastante altas de sal y azúcar (hasta 50% de azúcar), debido a esto, inicia su crecimiento en los vegetales más que cualquier otra BAL (Lappan et al., 1994).

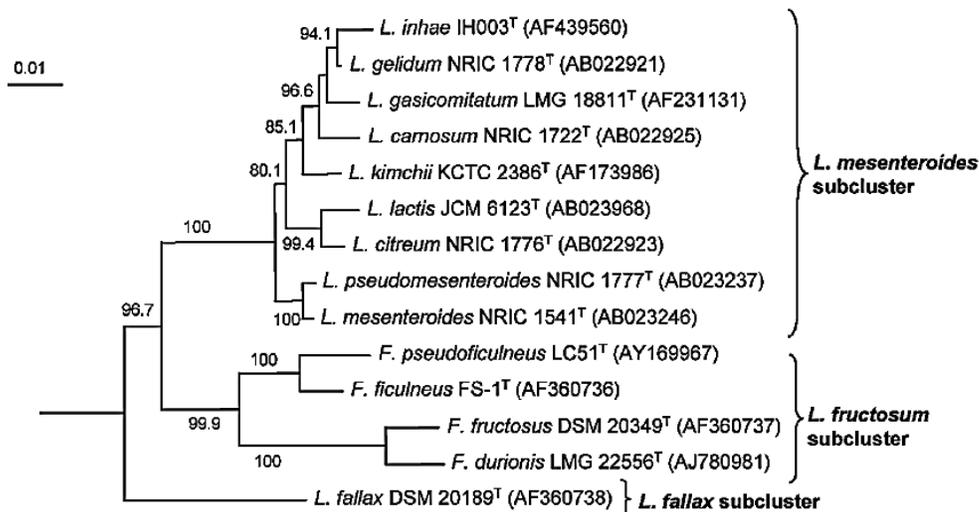


Fig 11. Relaciones filogenéticas del género *Leuconostoc* basado en la secuencia de genes 16S rRNA (Endo et al., 2008).

6.1 PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS (EPS)

Los exopolisacáridos microbianos (EPS) son biopolímeros constituidos principalmente por azúcares producidos por microorganismos (bacterias, levaduras, hongos y arqueas) localizados en el exterior de la célula microbiana, en las cubiertas microbianas más externas o glicocálix y a veces se encuentran desligados de la célula (Lappan et al., 1994). Los EPS se producen a partir de una fermentación microbiana. En la Fig 12 se muestran microcolonias en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares (EPS), la cual está compuesta por DNA extracelular (eDNA), polisacáridos, proteínas, fibras amiloides y los bacteriófagos. La función principal de la matriz de EPS es servir como un escudo para proteger a la comunidad bacteriana o de la población de los depredadores:

tales como protozoos o fagos líticos, así como de toxinas químicas (por ejemplo, biocidas y antibióticos). La matriz de EPS pueden ayudar a secuestrar nutrientes y a la creación de gradientes, por ejemplo, el oxígeno y los nutrientes que se difunden hacia el interior, y los productos de desecho, así como las señales: como el óxido nítrico que se difunden (McDougald et al.,2011).

Entre los principales grupos de biopolímeros se encuentran:

6.1.1 HOMO-EPS.

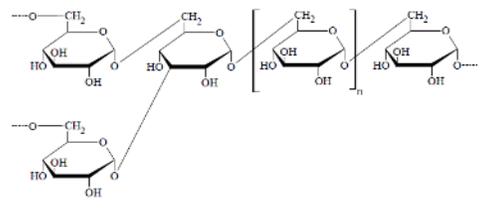
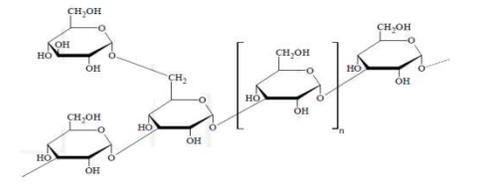
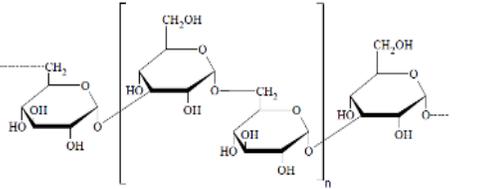
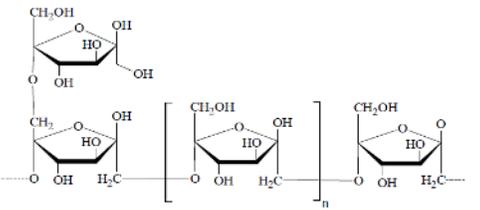
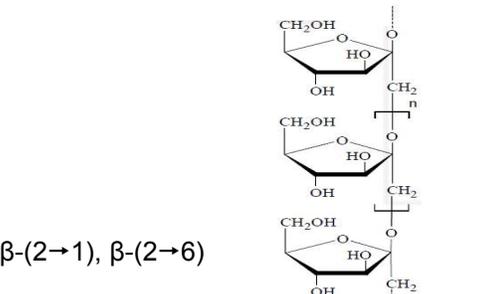
Se componen de un solo tipo de monosacárido (α -D-glucanos, β -D-glucanos y fructanos) y son sintetizados a partir de sacarosa usando glucansucrasa o levansucrasa (Tabla 6). Dos importantes grupos de homo-EPS son producidos por BAL:

- **α -glucanos**, compuestos principalmente de residuos de glucosa α -(1 \rightarrow 6) y α -(1 \rightarrow 3) denominados dextranos, producido por *L. mesenteroides subsp. mesenteroides* y *L. mesenteroides subsp. dextranicum* y *L. mutans*.
- **Fructanos**, compuesto principalmente de moléculas β -(2 \rightarrow 6) de fructosa, tales como levano producidas por *Streptococcus salivarius*.

6.1.2 HETERO-EPS

Los hetero EPS no son sintetizados por las enzimas extracelulares, sino que son sintetizados por una secuencia compleja de interacciones que implican enzimas intracelulares, mediante polimerización de unidades de repetición (tales como D-glucosa, D-galactosa, L-ramnosa), estas unidades de repetición son construidas por la adición de nucleótidos de azúcar en la membrana citoplasmática. La unidad de repetición se exporta a través de la membrana bacteriana, y se polimeriza para convertirse en un hetero-EPS. Esto se ha identificado en cepas de *S. thermophilus*, *L. lactis*, *L. delbrueckii*, y *L. helveticus*. (Lappan et al.,1994).

Tabla 6. Homo EPS producidos por BAL. Adaptada de (Lappan et al.,1994)

Homo-EPS	Vinculación principal (enlace de ramificación)	Organismos
α-Glucanos		
<p>Dextrana Una característica común de todos los dextranos es la preponderancia de vínculo α-(1\rightarrow6) con puntos de ramificación en las posiciones 2, 3, o 4.</p>	 <p>α-(1\rightarrow6), α-(1\rightarrow3)</p>	<p><i>L. mesenteroides subsp. mesenteroides</i>, <i>L. mesenteroides subsp. dextranicum</i>, <i>L. amelibiosum</i>, <i>L. curvatus</i></p>
<p>Mutana Contiene un alto porcentaje de enlaces α-(1\rightarrow3)</p>	 <p>α-(1\rightarrow3), (α-(1\rightarrow6))</p>	<p><i>S. mutans</i></p>
<p>Alternana Tiene enlaces alternativos α-(1\rightarrow6) y α-(1\rightarrow3), la cual es responsable de sus propiedades físicas distintivas que incluyen alta solubilidad y baja viscosidad</p>	 <p>α-(1\rightarrow3), α-(1\rightarrow6)</p>	<p><i>L. mesenteroides</i></p>
Fructanos		
<p>Levana Producido a partir de sacarosa. Es un fructano compuesto de moléculas de fructosa β-(2\rightarrow6) ligada moléculas con algunas ramificaciones β-(2\rightarrow1)</p>	 <p>β-(2\rightarrow6), (β-(2\rightarrow1))</p>	<p><i>L. mesenteroides</i>, <i>L. reuteri</i></p>
<p>Inulina Fructano compuesto de moléculas de fructosa β-(2\rightarrow1) vinculadas con moléculas β-(2\rightarrow6).</p>	 <p>β-(2\rightarrow1), β-(2\rightarrow6)</p>	<p><i>S. mutans</i></p>

7. PROBIÓTICO

El concepto de alimento funcional incluye que su ingesta se efectúe como componente habitual de la dieta y que éste ejerza sus efectos en las cantidades ingeridas normalmente en una dieta equilibrada. Dentro de los alimentos funcionales tienen un papel destacado, y en general bien reconocido, los probióticos y los prebióticos.

Los prebióticos son ingredientes alimenticios no asimilables por nuestro organismo que promueven la proliferación selectiva de bacterias intestinales beneficiosas como fructo oligosacáridos, inulina, lactulosa y galactooligosacáridos.

Los probióticos son suplementos alimentarios que contienen microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al huésped mejorando su equilibrio microbiano intestinal.

En la actualidad existe en el mercado una importante y variada oferta de productos suplementados con prebióticos y/o probióticos. El principal vehículo de administración de éstos son los productos lácteos, especialmente las leches fermentadas, aunque se pueden encontrar en muchos otros productos como helados, quesos, embutidos, zumos o cereales, y productos farmacéuticos en forma microencapsulada (Gamiño et al., 2005).

7.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE PROBIÓTICOS

Las cepas prebióticas cuentan con varias propiedades deseables con el fin de ser capaz de ejercer sus efectos beneficiosos. Los criterios de selección que se han considerado para ser relevante para cualquier potencial microorganismo probiótico se enumeran en la Tabla 1. Dependiendo del resultado deseado, un probiótico puede necesitar tener propiedades adicionales (Tabla 7 y 8). Sin embargo, un probiótico potencial no necesita contar con todos estos criterios de selección (Ouwehand et al., 1999).

Tabla 7. Criterios de selección de los microorganismos probióticos (Ouwehand et al., 1999)

Propiedades de la cepa probiótica	Observaciones
Capacidad de resistir ácidos gástricos y las sales biliares	Sobrevive a través del intestino, conservando la integridad celular, el mantenimiento de la adhesividad y la actividad metabólica.
Adhesión a componentes de la mucosa gastrointestinal	Modulación inmune, la exclusión competitiva de patógenos, prevención de la adherencia de patógenos, la colonización transitoria
Capacidad de producir componentes antimicrobianos	Acción antagonista hacia microorganismos patógenos
Seguridad biológica	Caracterización de la cepa. Seguridad documentada. No hay degradación de la mucosa intestinal. No invasiva
Propiedades tecnológicas	Fácilmente cultivable y mantener elevados niveles de viabilidad y estabilidad de sus propiedades en el producto. Resistencia de las cepas a la congelación y a la liofilización.
Capacidad de inmunoestimulación	Sin efectos pro inflamatorios

Tabla 8. Características adicionales de los microorganismos probióticos (Ouwehand et al., 1999).

Efecto de la cepa probiótica	Observaciones
Metabolismo del colesterol	Disminuyendo el pH de los contenidos del colon aumenta la biodisponibilidad de calcio. Mientras que algunos probióticos producen vitaminas B, otros son consumidores netos de vitamina B. La unión de los mutágenos, estimulación de las enzimas que metabolizan xenobióticos.
Biodisponibilidad de vitaminas y minerales	Disminuyendo el pH de los contenidos del colon aumenta la biodisponibilidad de calcio. Mientras que algunos probióticos producen vitaminas B, otros son consumidores netos de vitamina B.
Niveles de carcinógenos y mutágenos fecales	La unión de los mutágenos, estimulación de las enzimas que metabolizan xenobióticos.
Respuesta inmune	Aumentar la respuesta inmune en la inflamación. Reducir la respuesta inmune en caso de alergia. No se presentan cambios en la respuesta inmune en sujetos sanos.
Motilidad intestinal	Alivio de la constipación. Reduce la duración e incidencia de la diarrea.
Metabolismo de lactosa	Para sujetos con deficiencia a la beta-galactosidasa.
Actividad anti-caries	Reducir la unión y la actividad de los microorganismos cariogénicos
Producción de sustancias antimicrobianas	Inactivación de patógenos
Coagregación con patógenos	Mejora de la actividad anti-microbiana contra los patógenos. Exclusión competitiva

7.2 MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS

El espectro de microorganismos utilizados como probióticos en humanos es muy amplio e incluye especies de muchos géneros diferentes como *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Bacillus*, *Escherichia*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y algunas levaduras del género *Saccharomyces*. En la Tabla 9 se muestran algunos de los microorganismos empleados de forma habitual como probióticos.

Tabla 9. Principales especies microbianas utilizadas como probióticos, entre paréntesis las cepas más conocidas. (Gareau et al., 2010)

Probiotico	Enfermedad humana en la que se muestra en beneficio
Levadura <i>Saccharomyces boulardii</i>	Infección por <i>Clostridium difficile</i>
Bacteria Gram-negativa <i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	ND (no disponible)
Bacteria Gram-positiva <i>Bifidobacteria bifidum</i> <i>B. infantis</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> <i>Lactococcus lactis</i> <i>L. plantarum</i> 299v <i>L. acidophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> <i>L. casei</i> <i>Bacillus polyfermenticus</i>	ND ND Sepsis en recién nacidos de muy bajo peso al nacer Enfermedad de Crohn Diarrea asociada a antibióticos ND Diarrea pediátrica asociada a antibióticos ND ND
Regímenes combinados <i>L. rhamnosus</i> GG combinado con <i>B. lactis</i> VSL#3 (<i>Lactobacillus casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>B. breve</i> , <i>B. infantis</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i>)	Infecciones bacterianas Pouchitis y colitis ulcerosa pediátrica

7.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS

Los organismos probióticos pueden proporcionar un efecto beneficioso sobre las células epiteliales intestinales de numerosas maneras (Fig 13):

- A. Algunas cepas probióticas, bloquean la entrada de patógenos en las células epiteliales proporcionando una barrera física, lo que se denomina resistencia a la colonización o efecto barrera.
- B. Crear una barrera de moco, causando la liberación de moco de las células caliciformes.
- C. Otros probióticos mantienen la permeabilidad intestinal mediante el aumento de la integridad de las uniones estrechas intercelulares apicales, por ejemplo, mediante regulación al alza de la expresión de Uniones Oclusivas (una proteína de unión estrecha presente en el epitelio), o mediante la redistribución de la proteína de unión apretada deteniendo de este modo el paso de moléculas en la lámina propia.
- D. Algunas cepas probióticas han demostrado para producir factores antimicrobianos
- E. Otras cepas estimulan el sistema inmune innato por señalización células dendríticas, que viajan a los ganglios linfáticos mesentéricos y conducen a la inducción de las células T_{REG} (Linfocitos T reguladores) y la producción de citocinas anti-inflamatorias, incluyendo IL - 10 y TGF - β (Factor de crecimiento transformante beta).
- F. Algunos probióticos (o sus productos) también pueden prevenir (f1) o desencadenar una respuesta inmune innata (f2) mediante la producción de Factor de Necrosis Tumoral -TNF por células epiteliales e inhibiendo y/o activando el NF κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas) en Macrófagos y amortiguando la respuesta inmune del huésped al influir en la producción de IL-8 y el posterior reclutamiento de Neutrófilos a los sitios de lesión intestinal.

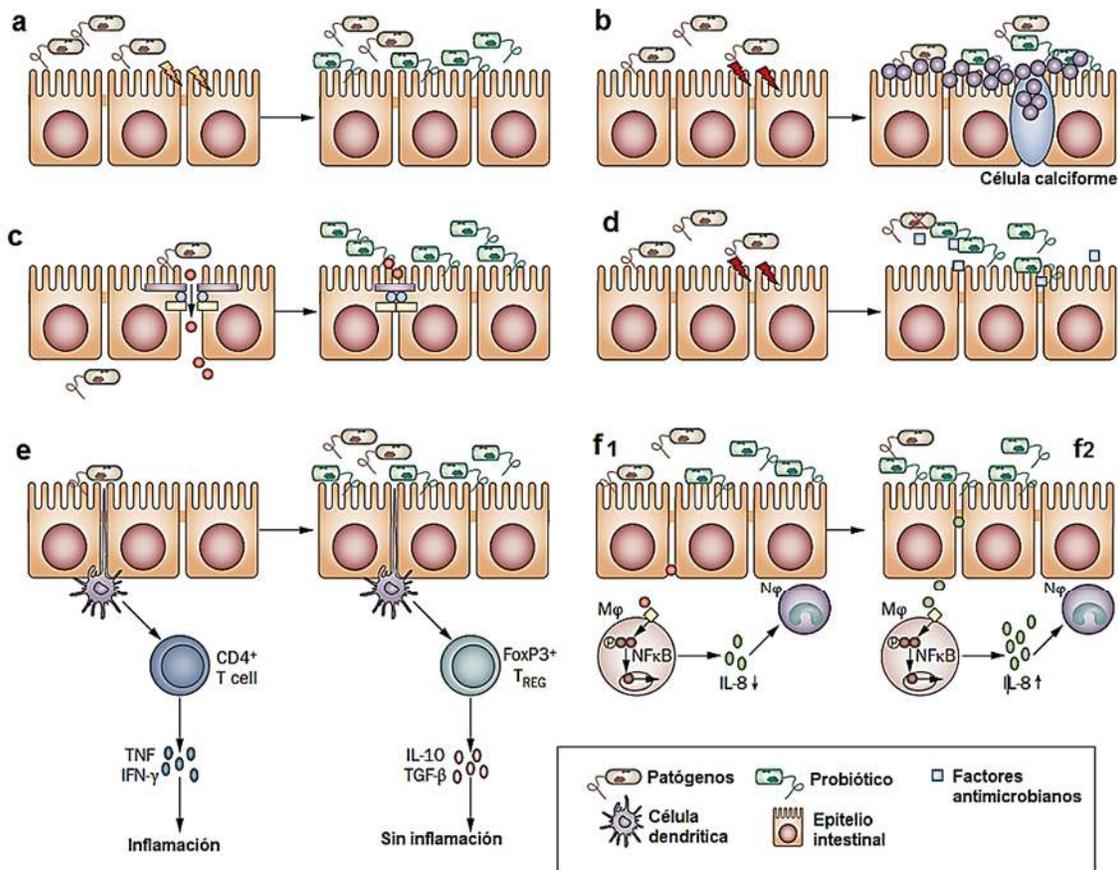


Fig 12. Mecanismos de acción de los probióticos (Gareau et al., 2010).

7.4 MICROBIOTA DEL TRACTO GASTROINTESTINAL (GI)

La microbiota normal, se refiere a la asociación simbiótica entre los diferentes microorganismos y el hospedero. Constituye un ecosistema complejo habiéndose identificado más de 400 especies bacterianas, aunque sólo entre 30 y 40 especies son encontradas comúnmente. Estos microorganismos se pueden derivar principalmente de los alimentos, el agua, el aire e incluso del tracto gastrointestinal superior (Gamiño et al., 2005).

La microbiota intestinal cambia con la edad, siendo distinta en la infancia y en la edad adulta. En la Figura 14 se muestra la evolución de los principales grupos microbianos intestinales desde el nacimiento a la vejez.

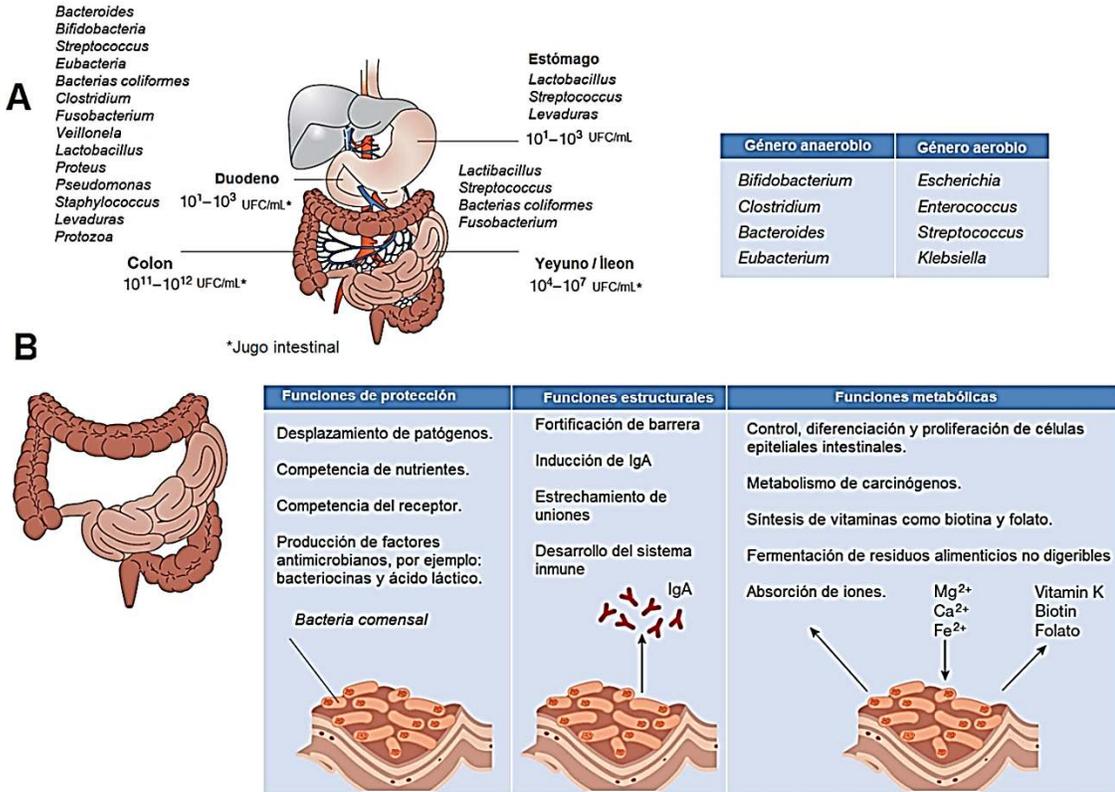


Fig 13. Funciones de la microbiota del tracto gastrointestinal. (A) La densidad de bacterias aumenta en el yeyuno / íleon desde el estómago y el duodeno, y en el intestino grueso. Los géneros aerobios y anaerobios más comunes se encuentran enlistados. (B) Las bacterias comensales ejercen una miscelánea de efectos protectores, estructurales y metabólicos en la mucosa intestinal (O'Hara et al., 2006).

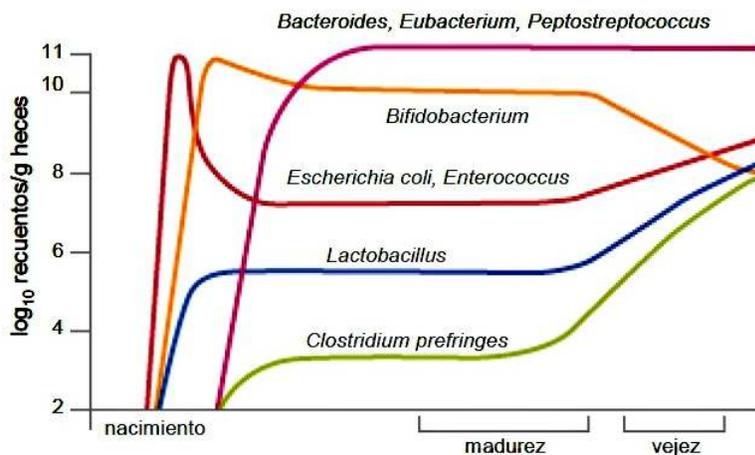


Fig 14. Evolución de la microbiota intestinal con la edad (Gamiño et al., 2005).

A lo largo de la vida el número de clostridios va aumentando mientras que la proporción de bifidobacterias disminuye. En la senectud es frecuente el aislamiento de *Clostridium difficile* y aparecen mayores niveles de mohos y enterobacterias en comparación con la microbiota de individuos jóvenes

Los microorganismos constituyen un enorme potencial enzimático en el intestino, desempeñando una amplia variedad de funciones metabólicas. Una de las más importantes es la hidrólisis o degradación de los componentes de la dieta (azúcares, proteínas, lípidos). A través de este proceso se obtiene energía y nutrientes, tanto para los propios microorganismos intestinales como para el hospedador. La fermentación de los carbohidratos resulta en una disminución del pH y la producción de metabolitos como los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés). Los SCFAs más abundantes en el intestino son el acético, el butírico y el propiónico y tienen una gran importancia en la fisiología y nutrición del TGI (Gamiño et al., 2005).

La capacidad metabólica de estos microorganismos incluye también la degradación de determinados compuestos tóxicos, favoreciendo de esta manera la eliminación de sustancias carcinogénicas y/o mutagénicas.

Los microorganismos en el intestino pueden participar igualmente en la síntesis de vitaminas y favorecer la absorción de diversos minerales como calcio, fósforo, magnesio y hierro.

En el intestino delgado el ambiente es fundamentalmente oxigénico y la mayoría de las reacciones microbianas son hidrolíticas. Por el contrario, el intestino grueso es anóxico y las reacciones bioquímicas son normalmente reductoras, aunque existen grandes diferencias en función de la sección del colon. Los productos de la fermentación de carbohidratos (SCFAs, gases y etanol) están presentes en altas concentraciones en el ciego y colon ascendente, donde la disponibilidad de sustratos es mayor. Por el contrario, los productos de la degradación de proteínas (amonio ácidos grasos de cadena ramificada, compuestos fenólicos y sulfurados volátiles) se producen fundamentalmente en el colon descendente (Gamiño et al., 2005).

JUSTIFICACIÓN

En nuestro país se ha incrementado la elaboración y consumo de los alimentos funcionales, debido a la tendencia actual de los consumidores, de buscar alimentos que aporten un beneficio a la salud, más allá del aspecto nutritivo. En México el aguamiel y pulque han sido reconocidos como bebidas saludables por siglos.

En nuestro grupo de investigación en el Instituto de Biotecnología y la Facultad de Química, UNAM, Campos (2010) aisló 13 cepas del pulque, de las cuales la cepa de *L. mesenteroides* denominada como P45 presentó mejores características en cuanto a la resistencia a pH ácido, así como a una alta concentración de sales biliares y con actividad inhibitoria contra *Escherichia coli* EPEC, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhi* y *S. typhimurium*. Posteriormente Matus (2011) administró esta cepa (P45) oralmente por 7 días a 18 ratones BALB/c de ocho semanas, observándose tanto en hígado como en bazo una disminución de uno o dos ciclos logarítmicos en la infección por *S. typhimurium*; presentando una mejor resistencia a la infección en las hembras que en los machos.

En el presente estudio se ha planteado la evaluación de su capacidad probiótica, mediante pruebas de capacidad antimicrobiana, localización celular y ensayos de adherencia celular, con el fin de aportar mayores evidencias científicas sobre su posible aplicación como bacteria probiótica

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Las propiedades antimicrobianas que le confieren potencial probiótico a la cepa de *Leuconostoc mesenteroides* P45 aislada del pulque, están asociadas a la presencia de bacteriocinas que se ven favorecidas por la producción de polisacáridos extracelulares en esta cepa.

OBJETIVO GENERAL

1. Estudiar si la producción de polisacáridos extracelulares (EPS) por la cepa de *L. mesenteroides* P45 mejora la capacidad antimicrobiana *in vitro* contra las bacterias patógenas *Escherichia coli* EPEC, *Salmonella entérica typhi*, *S. entérica typhimurium* y *Listeria monocytogenes*.
2. Búsqueda en la secuencia del genoma de la cepa P45 de secuencia(s) de genes que codifiquen para bacteriocinas y proteínas con actividad antimicrobiana (lisozima y peptidoglicano hidrolasa).
3. Determinar si la actividad antimicrobiana de la bacteriocina, lisozima y/o peptidoglicano hidrolasa están asociadas a la célula o son secretadas al medio extracelular.
4. Evaluar la capacidad de adhesión de la cepa P45 en modelos celulares eucariontes *in vitro* en condiciones de producción y no producción de EPS.

OBJETIVOS PARTICULARES

Objetivo particular 1.

- Evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* de la cepa P45 en condiciones de producción de EPS vs las bacterias patógenas indicadas en el objetivo general 1, mediante pruebas de inhibición de crecimiento *in vitro*.

Objetivos particulares 2.

- Búsqueda en la secuencia del genoma de la cepa P45 de los genes que codifican para bacteriocinas y glucanhidrolasas y determinación del tamaño del péptido/proteína correspondiente.
- Detección de la presencia de los productos de estos genes asociados a células y/o en sobrenadantes de un cultivo en líquido libres de células por electroforesis de proteínas.
- Determinar si las bandas de en un gel de proteínas (punto anterior) poseen actividad antimicrobiana por ensayos de actividad en zimogramas.

Objetivo particular 3.

- Evaluar la adherencia de la cepa P45 a las líneas celulares HeLa, Caco-2, Hep-2 y HT-29.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS, LÍNEAS CELULARES Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

Las cepas bacterianas y líneas celulares empleadas en este trabajo fueron se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 10. Cepas bacterianas, líneas celulares y medios de cultivo

Microorganismos	Medio de cultivo
<i>L. mesenteroides</i> P45	Se cultivó en caldo APT (DIFCO), incubándose a 37° C, O.N. Cuando fue requerido, la cepa se cultivó en caldo o placas de medio APT suplementado con sacarosa al 20%. Aislada de una muestra de pulque colectada en la localidad de Huitzilac, Morelos.
<i>E.coli</i> EPEC, <i>S. typhi</i> , <i>S. typhimurium</i>	Caldo nutritivo DIFCO
<i>L. monocytogenes</i>	Caldo nutritivo DIFCO con extracto de levadura 1%
<i>E.coli</i> Dα5, <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> EPEC 2348, 4966	Caldo BHI (Brain Hearth Infussion -DIFCO)
HEp-2 (carcinoma faríngeo) HeLa (carcinoma de cervix)	Medio Esencial Mínimo Gibco (MEM)
HT-29 (adenocarcinoma de colon)	Medio Esencial Mínimo Modificado Dulbecco (DMEM)
Caco-2 (adenocarcinoma colonrectal)	Medio Esencial Advanced-DMEM

2. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CEPA P45 BAJO CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE EPS.

Se evaluó la actividad antimicrobiana de LP45 sobre las bacterias patógenas *E. coli* EPEC, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* (Campos, 2010; Matus 2012). Para ello se realizó un precultivo de la cepa de P45 en 10 mL de medio ATP 37 °C durante toda la noche (O.N.) De este cultivo se inoculó un matraz de 250 mL con 50 mL de caldo APT incubándose bajo las condiciones descritas. De este cultivo, se ajustó a una $DO_{600nm} = 0.2$ y se depositaron 4 gotas equidistantes con ayuda de una pipeta Pasteur en placas APT, dejando incubar O.N.

De forma simultánea, se realizó un cultivo de las cepas patógenas *S. typhi*, *S. thypimurium*, *E. coli* EPEC y *L. monocytogenes* en matraces Erlenmeyer con 10 mL de caldo nutritivo y 10 mL de caldo nutritivo + 1% de Extracto de Levadura, incubando a 37 °C ON. Al cultivo resultante se ajustó la $D.O_{600nm} = 0.2$ y de este se mezclaron 500 μ L con 5 mL de agar nutritivo suave (7.5% agar), se vació inmediatamente sobre las placas de ATP inoculadas previamente con la cepa P45 y se incubó O.N. 37 °C. Al día siguiente se evaluó el efecto antimicrobiano de la cepa P45 por la presencia de un halo de inhibición de crecimiento en la sobrecapa de agar en la que se encuentra embebida la bacteria patógena alrededor de la colonia de la BAL.

Para evaluar si la presencia del polímero producido por la cepa P45 tiene algún efecto sobre la actividad antimicrobiana se realizó el ensayo de inhibición del crecimiento de las bacterias patógenas descrito, pero en este caso, se indujo la producción del EPS en la cepa P45 al realizar el crecimiento inicial en placas de APT suplementado con sacarosa.

3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA 45

Considerando que se tuvo acceso a la anotación del genoma de la cepa P45, se buscó la presencia de genes que codificaran para una bacteriocina, lisozima una y glucan hidrolasas. Con base en esta información se procedió a buscar una proteína tanto en la fracción celular y en sobrenadantes con el peso de 11, 27 y 32 kDa.

3.1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDA POR LOS SOBRENADANTES DE LA CEPA P45

Se inoculó la cepa P45 en 4 tubos de ensayo con 10 mL de caldo APT y se incubaron a 37 °C durante 24, 48, 72 y 96 h. Cada uno de los cultivos se centrifugó a 10,000rpm, 4 °C, 90 s. Se tomó una alícuota de 1 mL cada uno de los sobrenadantes obtenidos, y se concentraron al vacío 2x (Thermo Savant ®) durante 1 h o hasta alcanzar un volumen final de 500 µL.

Se preparon cajas de Petri con una base de agar APT al 15 % sobre la cual se vertió una segunda capa de APT 10 %, agregando finalmente una sobre capa de agar nutritivo suave con *S. typhi*, *S. typhimurium*, *E. coli* EPEC y/o *L. monocytogenes* ajustadas a una D.O_{600nm} = 0.2. Sobre estas placas se realizaron 4 pozos equidistantes con la base de una punta estéril y se colocó 90 µL de las muestras de sobrenadante concentradas (2x) previamente.

3.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MUESTRAS DE SOBRENADANTE LIOFILIZADAS, CÉLULAS ENTERAS, LISADOS CELULARES Y CITOSOL DE LA CEPA P45 EN PRESENCIA Y AUSENCIA DE PRODUCCIÓN DE EPS

Debido a que en los resultados de los ensayos descritos en la sección anterior no se observó la inhibición de las cepas patógenas, se procedió a analizar la actividad antimicrobiana a partir de las siguientes fracciones de la cepa P45 al cultivarla en medio APT y medio APT + sacarosa 20 % (Producción de EPS) :

- Muestras de sobrenadante liofilizadas (Fracción I)
- Células enteras (Fracción II)
- Fracción lisada libre de restos celulares (citosol).(Fracción III)
- Lisados celulares (Fracción IV)

A continuación se describe cómo se obtuvo cada fracción:

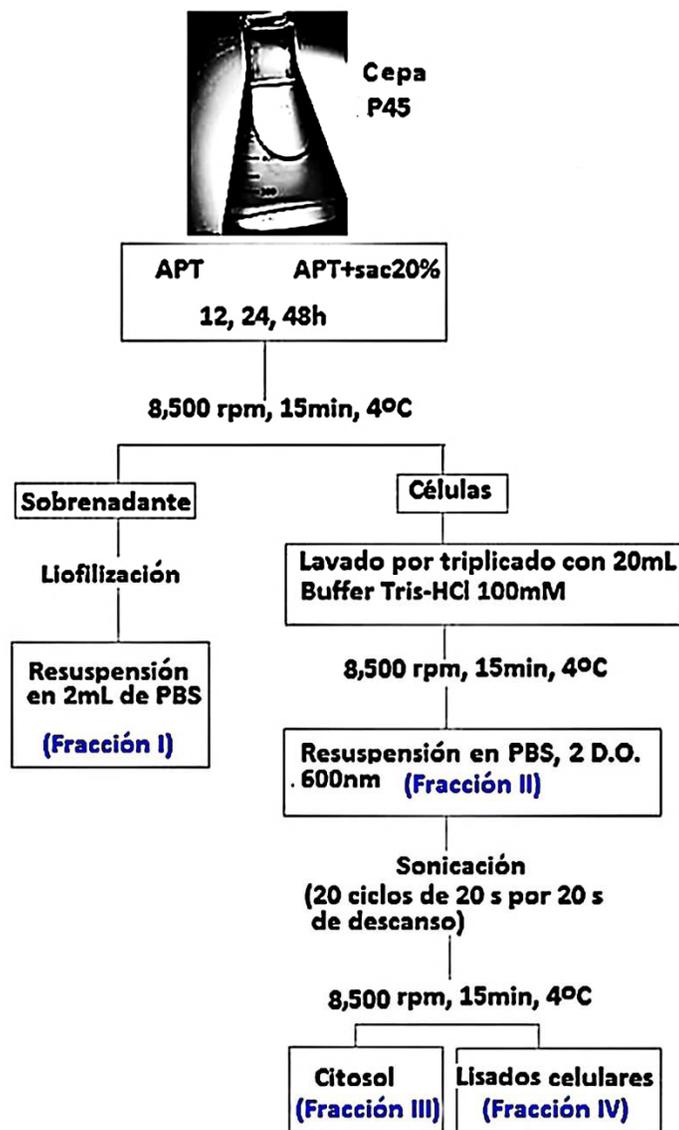


Fig 15. Metodología general de la obtención de las fracciones celulares de la cepa P45

Se realizaron cultivos de la cepa P45 en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de caldo APT (3X) y con 40 mL de caldo APT + sacarosa 20 % (3X), incubando a 37 °C durante 12, 24 y 48 h (Fig 15).

El volumen total de los 6 cultivos se centrifugó a 8,500 rpm por 15 min a 4 °C (Centrifuga Beckman J2-MC), congelando inmediatamente los sobrenadantes en un baño de etanol/hielo seco y se liofilizaron O.N. en un equipo Freeze Dry

System, Freezone 4.5 (Labconco). Al siguiente día las muestras liofilizadas se resuspendieron en 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS) 100 mM, pH 7 y se guardaron a -20 °C para su posterior uso. (**Fracción I**).

Por otro lado, las células enteras libres obtenidas de la centrifugación descrita anteriormente, se lavaron por triplicado con 20 ml de Buffer Tris-HCl 100 mM, posteriormente las muestras se centrifugaron 8,500 rpm por 15 min a 4 °C (Centrifuga Beckman J2-MC) y se resuspendió en buffer Tris-HCl 100 Mm ajustando cada muestra a una D.O._{600nm} = 0.2. (**Fracción II**). Parte de las células enteras obtenidas anteriormente, se realizó una sonicación a 20kHz (Hielscher UP400S) siguiendo un programa de 20 ciclos de 20 seg de por 20 seg de descanso. El citosol y los lisados celulares (**Fracción IV**) se separaron por centrifugación a 8,500 rpm, 4 °C, 15 min, en este caso el sobrenadante corresponde al citosol (**Fracción IV**). Las muestras se conservaron -20 °C.

Las 4 fracciones concentradas (20 X) fueron analizadas por ensayos antimicrobianos por difusión en agar, SDS-PAGE y zimogramas.

ENSAYO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Se realizó un precultivo *S. aureus*, *E. coli* Da5 y *L. monocytogenes* en 5 mL de caldo BHI durante 24 h a 37 °C. Se tomó una alícuota de 100 µL del mismo para inocular un tubo con 5 mL de caldo BHI durante 5 h hasta alcanzar la fase logarítmica donde se produce un incremento exponencial del número de microorganismos. De estos 3 cultivos se tomó una alícuota de 100 µL y se añadió a 900 µL de solución salina 0.85 %. Se tomaron 250 µL, se mezcló con 10 mL de agar BHI suave (0.8 %), y se vertió sobre placas de agar BHI. Una vez solidificadas las placas, se realizaron pozos con pipetas estériles de vidrio, en los cuales se depositaron 90 µL de cada una de las 4 fracciones de la cepa P45 obtenidas anteriormente correspondientes a los tiempos 12, 24 y 48h cultivadas en medio APT y medio APT + sacarosa 20 % (Producción de EPS). Las placas se dejaron en incubación O.N. a 37°C.

4. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA Y PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIMIROBIANA MEDIANTE ANÁLISIS EN SDS-PAGE Y ZIMOGRAMAS

4.1 SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) es uno de los métodos más utilizados para la purificación, análisis y caracterización de proteínas y enzimas. Con la finalidad de identificar una banda con el tamaño aproximado de la prebacteriocina y proteínas con actividad antimicrobiana encontradas en el genoma de la cepa P45, se realizaron SDS-PAGE al 15% con muestras de fracciones cultivadas tanto en APT como en APT + sacarosa de:

- Muestras de sobrenadantes liofilizadas (20x)
- Células enteras
- Citosol
- Lisados celulares

4.1.1 PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS PRESENTES EN LOS SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LA CEPA P45 (PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIÁLISIS)

Debido a que no se observaron bandas homogéneas correspondientes a los pesos moleculares esperados de 11, 27 y 32 kDa se realizó la purificación de las proteínas de los sobrenadantes (precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis) de cultivos de 24 y 48 h en APT con y sin sacarosa, ya que es en esta fracción donde se presentó mayor inhibición antimicrobiana y finalmente realizar un SDS-PAGE al 15%.

Para llevar a cabo la precipitación con sulfato de amonio se realizaron cultivos de la cepa P45 en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 40 mL de caldo APT y con 40 mL de caldo APT + sacarosa 20 %, y con la finalidad de incrementar la cantidad de biomasa se incubó a 37°C con agitación de 250 rpm, retirando un matraz a las 24 y 48 h, respectivamente. Los cultivos se centrifugaron a 7000 rpm, 4°C durante

20 min (Beckman J2-MC), y el sobrenadante se llevó a un pH neutro con NaOH al 50% (p/v) para así descartar que el efecto antimicrobiano se deba a la producción de compuestos como el peróxido de hidrógeno, ácidos orgánicos o diacetilo, entre otros. Cada muestra se precipitó con sulfato de amonio al 100 % (69.7g/100mL) de acuerdo con el Anexo II (Seguel et al., 1976) a 4°C y se dejó en agitación durante 1 h. Después se centrifugaron a 7000 rpm durante 20 min a 4°C (Beckman J2-MC). El precipitado se resuspendió en 1.0 mL de PBS y se dializó durante 12 h a 4°C con una membrana de corte de 11 kDa (*Dialysis tubing cellulose membrane –Sigma Aldrich D9777*) y usando PBS como solvente para eliminar el sulfato de amonio y otras impurezas.

Se llevó a cabo la cuantificación de proteínas (NanoDrop 2000 Thermo Scientific) de cada muestra obtenida anteriormente y se ajustaron a 10 mg/mL, estas muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% (Ver Anexo III) y se realizó una electroforesis en una Cámara Mighty Small II para geles de 8x7 cm, usando buffer Tris-Tricina (10x, pH=8) y un campo eléctrico de 80 mV durante 1 h. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 0.02% durante 10 minutos y se destiñó en una solución de metanol 45 %-ácido acético 40 % durante 20 min.

4.2 ZIMOGRAMA

Para observar la actividad de las enzimas *in situ*, se llevó a cabo esta técnica electroforética y a diferencia de las electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) se trata de utilizar condiciones suaves (sin agentes reductores) para evitar la pérdida de actividad de las enzimas estudiadas.

La preparación de geles de poliacrilamida al 15% (p/v) utilizados ser prepararon de la siguiente manera:

Tabla 11. Preparación en gel poliacrilamida

	Separador (15%)	Concentrador (4%)
Acrilamida 37.5:1	4.25 mL	324 µL
Buffer de gel Tris-HCl/SDS pH=8	2.83 mL	630 µL
Agua destilada	0.51 mL	1.6 mL
Glicerol 80%	0.895 mL	-----
Persulfato de amonio 10%(m/v)	42.5µL	13.6 µL
TEMED	5.66 µL	1.5 µL
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> *	17 mg*	-----
Volumen final	8.5 mL	2.5 mL

* Pellet liofilizado. Base seca

Después de verter el gel separador se agregó isopropanol para eliminar la espuma formada y evitar que el gel se oxidara, finalmente se vierte el gel concentrador en la parte superior.

Se emplearon muestras de los cultivos durante 24 y 48 h en caldo APT y en de caldo APT + sacarosa 20 %, estas muestras fueron:

- Muestras de sobrenadantes liofilizadas (20x)
- Células enteras
- Citosol
- Lisados celulares
- Sobrenadantes purificados (precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y diálisis)

Cada muestra se mezcló con un buffer de corrida (Tris-HCl 1 M pH 6.8, glicerol al 24% (v/v) SDS al 8% (p/v) y azul brillante de Coomasie al 0.02% (p/v)), que no contenía β -mercaptoetanol, esto con el propósito de no comprometer la integridad de las proteínas. Las muestras de células se calentaron a ebullición durante 10 min. Las condiciones de la electroforesis fueron 120 mA. Después de la separación de la muestra por SDS-PAGE, el gel se lavó con agua desionizada y se dejó en incubación O.N. con una solución renaturalizante de proteínas (Tritón 1%, Tris-HCl 100 mM pH=8). El zimograma mostró la presencia de una banda clara o translúcida al observar sobre un fondo opaco, como resultado del efecto inhibidor de la bacteriocina de la cepa P45. Para aumentar el contraste, el gel fue teñido con una solución de azul de coomasie en KOH 0.01% (p/v) durante 20 min y posteriormente desteñido en agua hasta observar la aparición de las bandas.

5. ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR IN VITRO

Una de las características consideradas como esenciales de un microorganismo probiótico es la adherencia a superficies epiteliales y su persistencia en el tracto gastrointestinal. Para evaluar si la cepa de *Leuconostoc* P45 posee esta capacidad, se realizaron ensayos de adhesión a líneas de células HEP-2, HeLa, HT-29, y Caco-2.

5.1 CONDICIONES DE CRECIMIENTO DE LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares se recuperaron de su almacenamiento en nitrógeno líquido. Es importante descongelarlas adecuadamente para mantener su viabilidad. Poco a poco, las células se diluyeron en un medio de crecimiento (siguiente sección) en un matraz y se incubaron 37° C en atmósfera de 5 % de CO₂. Las Células HEP-2 y HeLa se cultivaron en Medio Esencial Mínimo Gibco (MEM)®, las células HT-29 en medio Medio Esencial Mínimo Modificado Dulbecco (DMEM) y las Células Caco - 2 en Advanced DMEM Gibco®, dejándolas en incubación, 37 ° C en una atmósfera de 5% de dióxido de carbono, dentro de frascos para cultivo celular BD Falcon™.

5.2 SUBCULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares adherentes deben ser subcultivadas en los medios y en las condiciones ya descritas para evitar que las células mueran por falta de nutrientes.

Una vez crecidas las células los cultivos se examinaron usando un microscopio invertido, buscando que estas tuvieran una confluencia mayor al 80 %, para confirmar la ausencia de contaminantes bacterianos y fúngicos y para revisar que las células no estuvieran dañadas, y realizar subcultivos en caso necesario. El grado de adhesión es variable, cada medio de cultivo se decantó y el área del frasco donde hubo crecimiento de monocapa celular se lavó al pipetear y decantar con 2 mL de **Solución Puks**: (NaCl 8 g/L, KCl 0.4 g/L, NaHCO₃ 0.35 g/L, EDTA 0.34 g/L) para liberar las células del frasco.

Se añadieron 2 ml de solución de Puks asegurando de cubrir toda la superficie, y se dejó 5 min en incubación con CO₂ o hasta que las células se desprendan. Hay que tomar en cuenta que una exposición prolongada de las células a la solución Puks puede dañar los receptores de la superficie celular. Finalmente se añadieron 2 ml de Medio MEM, DMEM o Advanced- DMEM de acuerdo a la línea y se suplementan con 10 % suero bovino fetal (SFB) para promover un mayor crecimiento celular, dejando en incubación en CO₂ a 37 °C.

5.3 PREPARACIÓN DE LA MICROPLACA

Los cultivos celulares con más de un 80% de confluencia previamente incubado se lavaron con 2 mL de solución PUCKS, desechando está por el lado contrario de la monoacapa, y repitiendo el lavado en caso de que las células se encontraran fuertemente adheridas, golpeando suavemente la base para liberar las células. Se adicionaron 2 mL de solución PUCKS dejando en incubación a 37 °C 5 min en CO₂. Posteriormente se centrifugó a 1800 rpm durante 10 min para remover la solución, resuspendiendo cada línea celular en 25 mL de su respectivo medio, suplementados con SFB y penicilina/estreptomicina 10000 µg/mL. Se colocaron cubreobjetos plásticos Thermanox® en cada uno de los pozos de la microplaca de cultivo celular (CORNING Costar®), adicionando 1 mL de las células previamente resuspendidas y se dejó en incubación en CO₂ a 37 °C ON.

5.4 PREPARACIÓN DEL INÓCULO BACTERIANO

Las cepas control de *E. coli* EPEC E2348 y E4966 se inocularon en 3 mL de agua triptonada 1% con 300 µL de una solución al 1 % de D-manosa para promover la expresión de fimbrias tipo I. La cepa P45 se inoculó en 3 mL de caldoAPT + 300 µL de una solución de D-manosa al 10% y en 3 mL caldo APT suplementado con 20% sacarosa y 300 µL de D-manosa al 10%. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C ON. Al siguiente día, las células se centrifugaron a 2500 rpm por 15 min a 4 °C. El pellet obtenido se resuspendió en PBS y se ajustó a 1.0 McFarland (3.0 x 10⁸ UFC/mL).

5.5 PRUEBA DE ADHESIÓN BACTERIANA

La monocapa de cada línea células se preparó sobre un cubreobjetos de plástico Thermanox® a los cuales se adicionaron 100 µL de inóculo bacteriano y 900 µL de medio (MEM, DMEM, Advanced DMEM Gibco® de acuerdo a la línea celular en estudio) + D-manosa 10%. En el caso de la cepa de P45 se inocularon 100 µL de cultivo ajustado a 1.0 McFarland con:

900 µL de caldo APT

900 µL de caldo APT + D-manosa 10%

900 µL de caldo APT + sacarosa 20%

900 µL de caldo APT + sacarosa 20% + D-manosa 10%

Las microplacas se incubaron a 37 °C durante 3 h. Después de la incubación se eliminó el medio de cada pozo y la monocapa se lavó 3 veces con PBS evitando tocar los cubreobjetos plásticos, seguidos de una fijación con metanol 70% durante 1 min para luego teñir con colorante de Giemsa durante 8 min. Cada cubreobjetos plástico se sumergió en acetona, acetona-xilol (50-50) y xilol para evitar la turbidez debida a soluciones que contienen agua para finalmente fijarlas con bálsamo de Canadá. Es necesario considerar que la distribución de la muestra debe ser homogénea, colocando encima cuidadosamente un cubreobjetos de manera que no queden burbujas de aire incluidas. Las preparaciones se dejaron en posición horizontal dejando secar para poder observar al microscopio y de este modo conservan el color como mínimo durante 5 años.

Las bacterias adherentes se contaron al microscopio a 100 X tomando 20 campos microscópicos al azar por cada monocapa sobre cubreobjetos plásticos. La capacidad adhesiva de la bacteria se calculó como lo describe Del Re., *et al* 2000, basado en el número de bacterias adherentes, se propusieron tres categorías: no adhesiva (<5 bacterias adheridas a 100 células); adhesivo (6-40 bacterias adheridas a 100 células); adhesivo fuerte (> 40 bacterias adheridas a 100 células).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CEPA P45 BAJO CONDICIONES DE PRODUCCIÓN DE EPS

1.1 CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE EPS

La presencia de exopolisacáridos microbianos producidos por la cepa P45, se pone de manifiesto por la mucosidad desarrollada por las colonias al crecer en placas de APT con sacarosa (20%), las cuales son de mayor tamaño y tienen mayor capacidad bactericida contra *S. typhi*, *S. typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes* en comparación con la cepa P45 cultivada solo con APT (Fig 17 y 18).

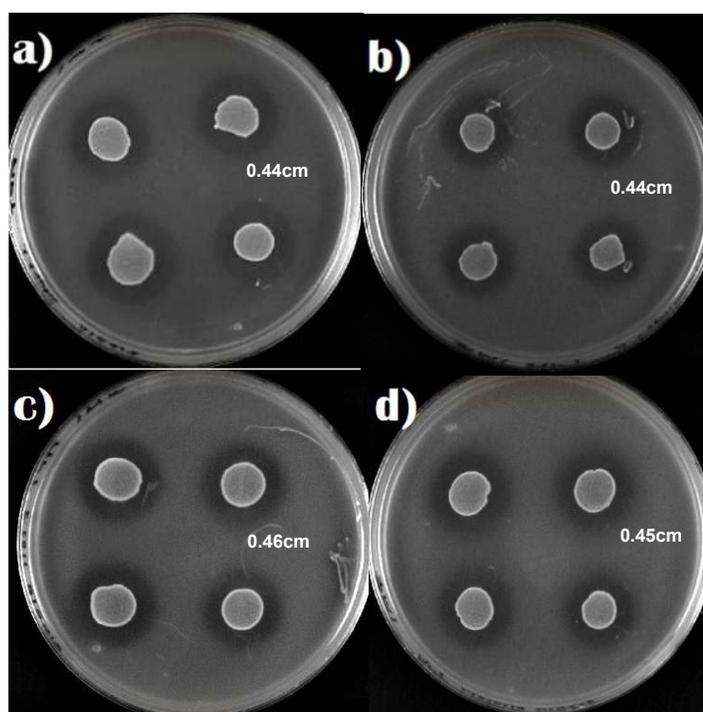


Fig 16. Halos de inhibición alrededor de colonias de *L. mesenteroides* P45 en agar APT. a) *S. typhi*, b) *S. typhimurium*, c) *E. coli* y d) *L. monocytogenes* (Se indica diámetro promedio de la zona de inhibición).

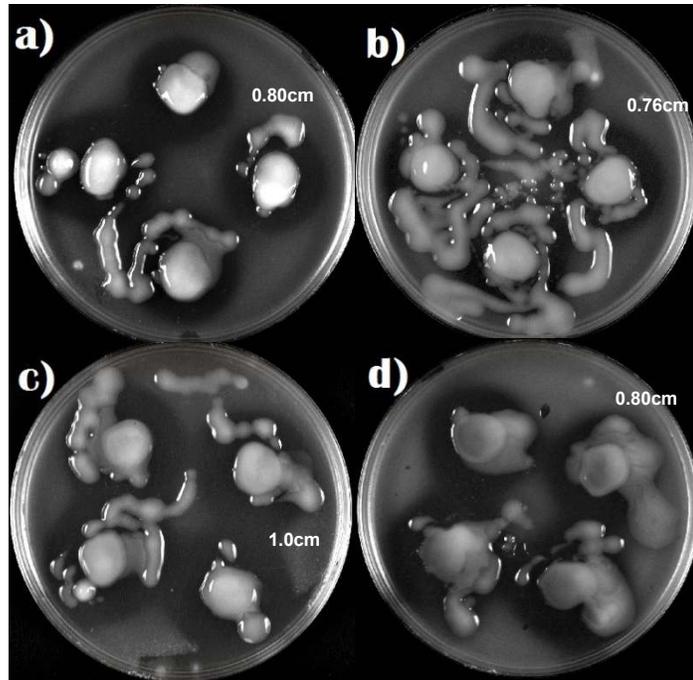


Fig 17. Halos de inhibición alrededor de colonias de *L. mesenteroides* P45 en agar APT+ Sacarosa 20%. a) *S. typhi*, b) *S. typhimurium*, c) *E. coli* y d) *L. monocytogenes* (Se indica diámetro promedio de la zona de inhibición).

La bacteria *L. mesenteroides* se caracteriza por su capacidad de producir EPS en medios que contienen sacarosa, la cual es usada por esta bacteria como sustrato para la síntesis de este tipo de polímero. La capacidad de producción de EPS, está asociada a la presencia de enzimas glucosiltransferasas (GTFs) extracelulares las cuales hidrolizan la sacarosa y utilizan el residuo de glucosa para la síntesis del polímero tipo dextrana principalmente, aunque se han aislado algunas especies de *Leuconostoc* con capacidad de producir fructanas las cuales son sintetizadas por fructosiltransferasas a partir de la sacarosa presente en el medio (Fraga et al., 2011). En la literatura, el único antecedente sobre la producción de dextranas por *L. mesenteroides* aislado del pulque es por la cepa denominada IBT-PQ, la cual produce una dextrana conformada por unidades de glucosa en α -(1 \rightarrow 6) con enlaces en α -(1 \rightarrow 3) (Chellapandian et al., 1998). Aunque en este trabajo no se caracterizó el polímero producido por la cepa P45, se puede suponer que se trata de una dextrana.

De forma paralela al desarrollo de este proyecto, se secuenció el genoma de la cepa P45, y dentro del primer borrador de su anotación, se encontró la secuencia de un gen codificante para la GTF (GtFg1_LP45), la enzima responsable de la síntesis de dextrana a partir de la sacarosa.

De acuerdo a nuestros resultados, la capacidad de producción de EPS por la cepa P45, favorece el efecto inhibitorio del crecimiento de las cepas patógenas analizadas. No existen reportes de que la capacidad de producción de un EPS en cepas productoras de *Leuconostoc* se asocie con un efecto antimicrobiano, aunque si se ha reportado el posible papel como prebiótico de este tipo de polímeros (Aucher et al., 2004). Se ha propuesto, que la producción de una matriz extracelular, en este caso un EPS permite la presencia de gradientes de diferentes sustancias, incluyendo nutrientes, moléculas señalizadoras, desechos celulares, etc (McDougald et al., 2011). De acuerdo a esto, una posible explicación de la mayor inhibición del crecimiento de cepas patógenas en condiciones de producción del polímero (Fig 18) se asocia a la posible presencia de componentes localizados dentro de la matriz extracelular, tales como sustancias de tipo bacteriocinas y metabolitos con efecto antimicrobiano, que favorecen esta mayor inhibición en comparación con condiciones de no producción de este polímero

2. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA PRODUCIDA POR LA CEPA P45

Considerando que las BAL son productoras de compuestos con efectos antimicrobianos entre los que se incluyen bacteriocinas a partir de la anotación del genoma de la cepa P45, se buscaron genes que codifiquen para este tipo de moléculas (Tabla 12), encontrándose genes codificante para una prebacteriocina, una lisozima (1,4- β -N-acetylmuramidasa) y una peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murein_hidrolasa). El tamaño del producto de estos genes considerando es de 11, 27 y 32 kDa, respectivamente. Con esta información, se procedió a detectar si estas moléculas se encuentran asociadas a la célula o son liberadas al medio.

Tabla 12. Moléculas de la cepa P45 con efectos antimicrobianos

Función	Secuencia de aminoácidos	Peso molecular (kDa)
Prebacteriocina P45	MQKDEKVETMLDQ (MSVAFSDEDVKNQPELREMIFNYAQELTKTQNTGLVATKMKVSLV QYYWITKTQLPEAAIKLHHQIKRDATVYDGIAMSAMLLPWWF)	11.6 10.0*
Lisozima (1,4-β-N-acetylmuramidasa)	MENVFASASQYKTKKLLTFTSWLLILSGIVCSFTVWVFAKPVVTQTN TIPSGFSVQGVSNQTSNYVDFNNLASNGVSFVYMRRTTSGSSVMDG GYKSSFSAKSAHLKVGTHVYDASVTAATQAQYYIDNVGNIGELPI AISVTADQISTATSKQRLASLVQILASHYNHDMIIYTPNVQKKSSTI SKTKYWLIEDNTKNTDSKNLFIQYDEDQTIGSGLKAIKMPTTVFNGT QKQFEVYK	27
Peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murein_hidrolasa).	MIKKWLLSNLIGIITVSVLITVVGLIISLVSKEEIIHPNNVQFRNGPGRQ YKSLVSLKSGTRLIVIDKKHGWVQVRRSDNEKVGWVASWVANSTIL KTAKPISEATIVLDPGHGGSDTGALSSNGKYKEKTYTLRTARHVRAA LKLGTGARVIMTRDSDKIVPLLEIAPGERNNADAQISFHFDSAEGTKA TGISQYYYHKNSTLAEVVSSSLNNMPLNRRGVDTAAIYAIKNTSQP AILLENGFINNADLKIRKSSYQKKIAKNLTTALTTYFKRNTMKG-	32

Entre paréntesis se muestra la secuencia aproximada de 10 kDa de la bacteriocina activa de la cepa P45

2.1 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA PRODUCIDA POR LOS SOBRENADANTES DE LA CEPA P45

Se evaluó la posible presencia de moléculas con efectos antimicrobianos en muestras de sobrenadante de cultivos de la cepa P45 de caldo APT y APT con sacarosa (20%) (12, 24 y 48h) concentradas 2x. Los resultados obtenidos demostraron que ninguna de las muestras generó inhibición debido probablemente a que estas moléculas no se encuentran en una concentración adecuada que garantice un efecto inhibitorio (Fig 16).

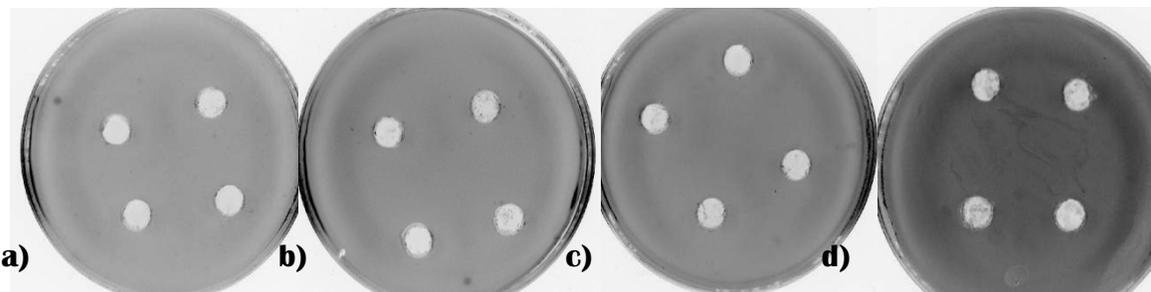


Fig 18. Difusión en agar de muestras de sobrenadante concentradas (2X) de *L. mesenteroides* P45 durante 48 h en agar APT a) *S. typhi*, b) *S. typhimurium*, c) *E. coli* PEC y d) *L. monocytogenes*

2.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MUESTRAS DE SOBRENADANTE LIOFILIZADAS

2.2.1 MUESTRAS DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS EN CALDO APT SIN SACAROSA

El análisis de las muestras concentradas a 20X de sobrenadantes de cultivos sin sacarosa (12, 24 y 48 h), permitió observar únicamente un efecto inhibitorio en la muestra de 24 h contra *E. coli* Da5 (Fig 18.a). Estos resultados sugieren un efecto inhibitorio contra una bacteria Gram-negativa de una posible bacteriocina o lisozima presente en el sobrenadante a las 24 h. Una posible explicación de que este efecto no se observó en las muestras de la hora 12 y 48, se debe a que en el primer caso aún no se encuentra en una concentración que tenga un efecto inhibitorio o a una posible degradación de las mismas para el segundo caso.

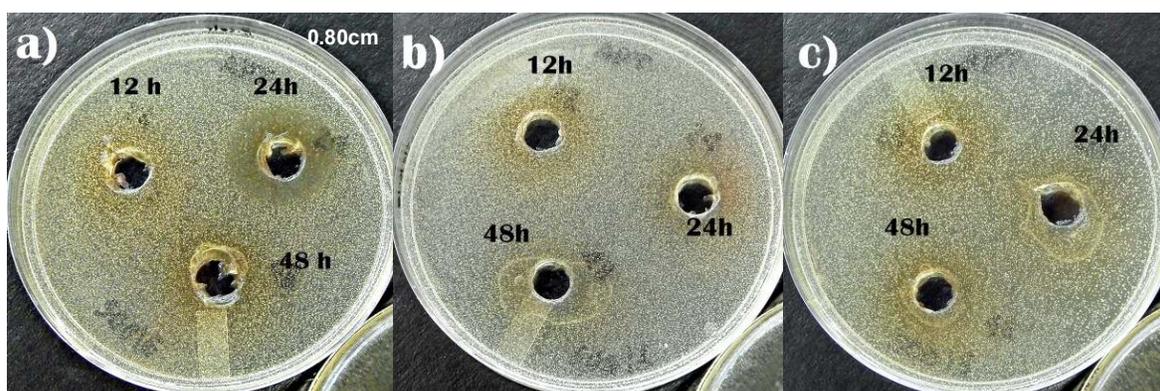


Fig 19. Halos de inhibición de muestras de sobrenadante liofilizadas (20x) de *L. mesenteroides* P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT a) *E.coli* Da5 b) *Listeria monocitogenes* y c) *S.aureus*.

2.2.2 MUESTRAS DE SOBRENADANTES DE CULTIVOS EN CALDO APT CON SACAROSA

En este caso se trabajó con sobrenadantes concentrados 20x de cultivos de 12, 24 y 48 h contra bacterias Gram-negativas *E. coli* Da5, *S. typhi*, *S. typhimurium* y la bacteria Gram-positiva *Micrococcus lysodeikticus*. En la muestra de la hora 12 no se observó efecto probablemente a una baja concentración de moléculas,

mientras que en las muestras de las horas 24 y 48 se observa un halo de inhibición con un diámetro similar, los cuales son mayores en comparación con los halos de inhibición observados en muestras de sobrenadantes liofilizados contra *E. coli* Da5 (Fig 18). Posiblemente, esto se puede atribuir a que la producción de la matriz extracelular favorece la presencia de proteínas inhibitorias manteniendo la integridad funcional.

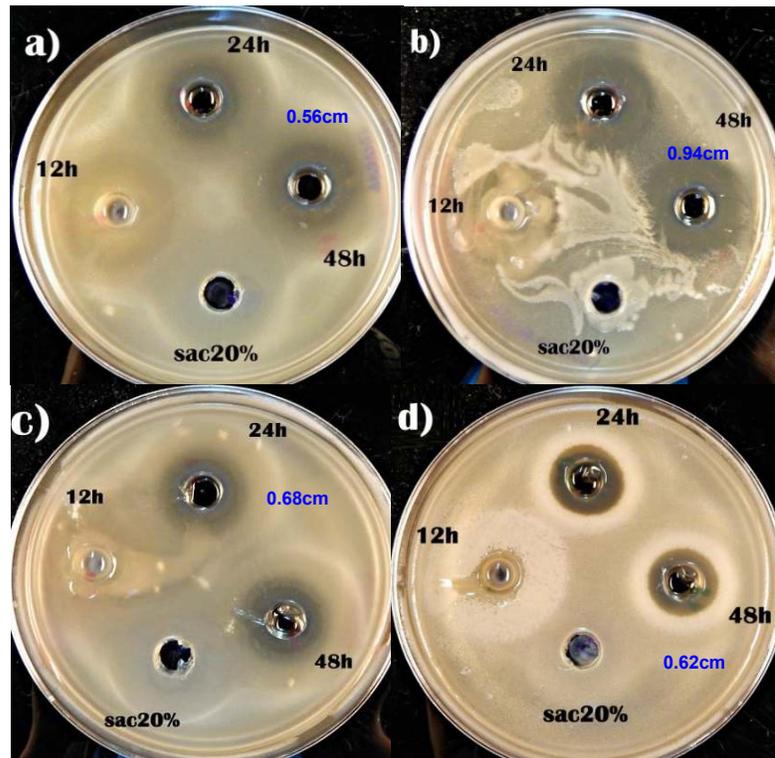


Fig 20. Halos de inhibición de muestras de sobrenadante liofilizadas (20x) de *L. mesenteroides* P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT + sacarosa 20%, a) *S. thypi*, b) *S. thypimurium* c) *E. coli* Da5 y d) *M. lysodeikticus*. Sac 20%= Caldo APT + sacarosa 20% liofilizado (20x).

2.2.3 MUESTRAS DE CÉLULAS ENTERAS, LISADOS CELULARES Y CITOSOL DE LA CEPA P45 EN CALDO APT Y CALDO APT CON SACAROSA

Para comprobar si el efecto inhibitorio de la cepa P45 se encuentra asociado a componentes celulares, se llevó a cabo una prueba de difusión en agar con células enteras, lisados celulares y citosol de cultivos de 12, 24 y 48 h contra *E.coli* Da5, *S. typhi*, *S. typhimurium* y *Micrococcus lysodeikticus*. Sin embargo solo se observó de las muestras de células de las horas 24 y 48 cultivadas en APT + sacarosa (20%) contra *E. coli* Da5 y *M. lysodeikticus* (Fig 20). En este caso, los halos de inhibición son de menor tamaño en comparación los observados en los ensayos con sobrenadantes de muestras de APT + sacarosa (20 %) liofilizadas (Fig 19). Las muestras de células enteras en caldo APT sin sacarosa, la de lisados celulares y citosol tanto en caldo APT y caldo APT con sacarosa (20 %) no mostraron inhibición contra ningún microorganismo (resultados no mostrados). La Fig 21 muestra un comparativo de los resultados de inhibición descritos en estas secciones.

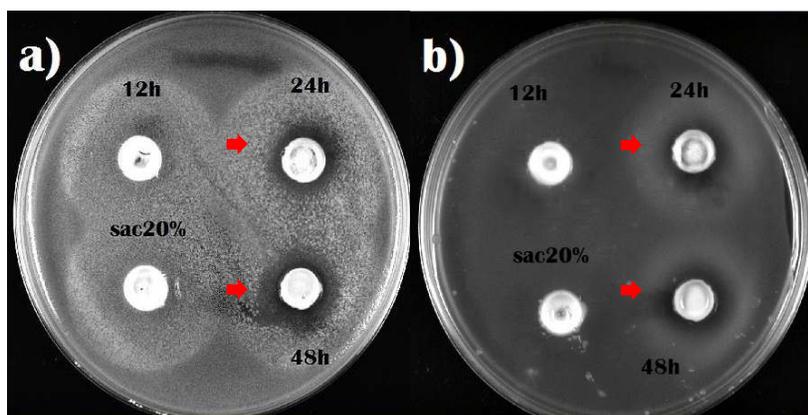


Fig 21. Halos de inhibición de células de *L. mesenteroides* P45 durante 12, 24 y 48 h en agar APT+sacarosa 20% a) *M. lysodeikticus* b) *E. coli* Da5.

Halos de inhibición bacterianos de las fracciones de cepa P45

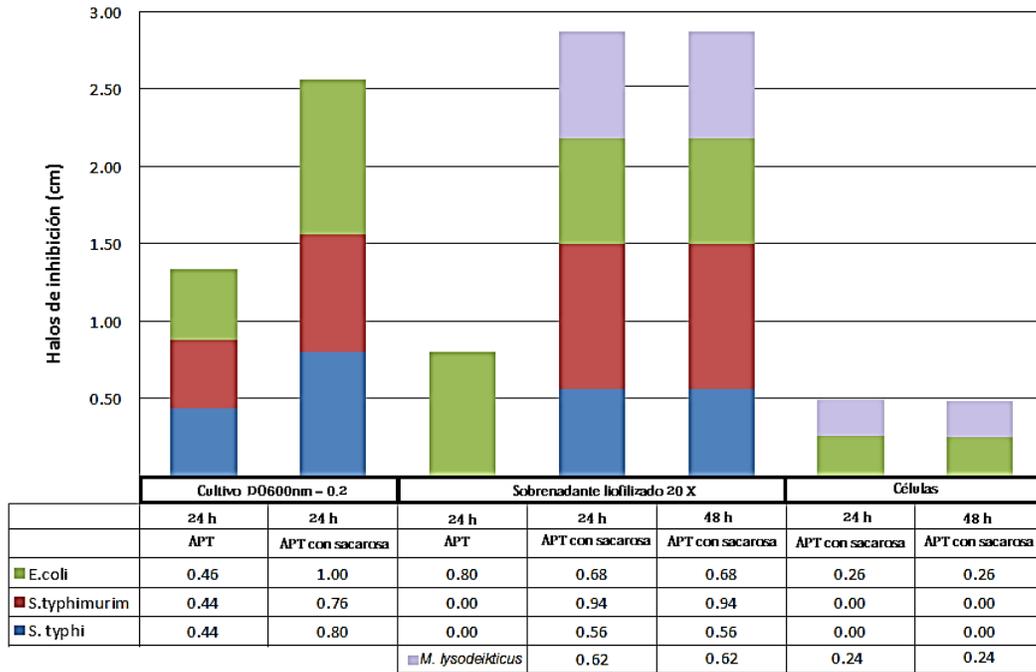


Fig 22. Comparación de los halos de inhibición antimicrobianos de la cepa P45 en las diferentes condiciones de cultivo (APT con y sin sacarosa 20) y tiempos de fermentación analizados.

De acuerdo a las inhibiciones observadas con los sobrenadantes liofilizados 20 X (Fig 21) se puede suponer que el efecto antimicrobiano está asociado a la presencia de proteínas, y péptidos con actividad antimicrobiana, lisozima, peptidoglicano amidasa y prebacteriocina, ya que todas las muestras de sobrenadante fueron neutralizadas previamente, para evitar que el efecto inhibitorio se debería a la presencia de un ácido orgánico,

3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PREBACTERIOCINA Y PROTEÍNAS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

3.1 SDS-PAGE

El análisis de las muestras de sobrenadantes liofilizadas (20x), células enteras, citosol, lisados celulares y sobrenadantes purificados de cultivos en APT con y sin sacarosa por medio de SDS-PAGE al 15%, permitió identificar dos bandas en la muestra que corresponde al sobrenadante purificado: una de 10.0 kDa correspondiente al tamaño esperado de la bacteriocina y una segunda banda arriba del marcador de 70 kDa que es común en todas las muestras analizadas, la cual pudiera corresponder a murein hidrolasa N-acetilmuramil-L-alanina amidasa con un peso de 71.4 kDa (Fig 23). En ninguna de las otras muestras analizadas se observó una banda del tamaño esperado con la secuencia (11.6, 27 y 32 kDa).

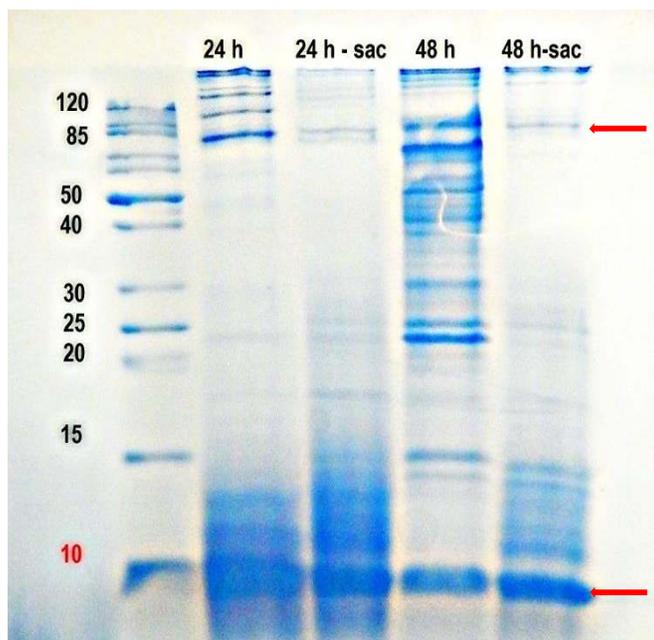


Fig 23. Electroforesis en gel de poliacrilamida- dodecil sulfato de sodio al 15% de bacteriocina (10kDa) precipitada con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a partir de los sobrenadantes de *Leuconostoc mesenteroides* P45 a las 24 y 48 h de fermentación. (PageRuler™ Unstained Protein Ladder #SM0661 Fermentas) (Las flechas rojas indican la presencia de la bacteriocina y la N-acetilmuramyl-L-alanina amidasa).

De acuerdo al tamaño observado para la bacteriocina de 10 kDa y de acuerdo a la información reportada para los distintos tipos de bacteriocinas, esta molécula puede ser clasificada provisionalmente como: No-Lantibiótico (Clase II), péptido de bajo peso molecular, termoestable, sintetizado en el ribosoma como un péptido inactivo y que adquiere su función por el corte post-traduccional en el N-terminal del péptido líder. Este tipo de bacteriocinas induce la formación de poros en la membrana de las células blanco. Estos resultados se consideran de gran relevancia debido a que la mayoría de las bacteriocinas producidas por las especies de *Leuconostoc* tienen masas moleculares menores, tales como la leucocina A-TA33a (3.93 KDa), leucocina CTA33a (4.59 KDa), mesentericina Y105 (2–3 kDa) y mesenterocina 52A (2000–3000 Da) (Johansson et al., 2011).

Se ha reportado (Cibik et al., 2005) que el género *Leuconostoc* posee enzimas proteolíticas intracelulares como otras BAL, y en la cepa *L. mesenteroides* 10L además se han caracterizado peptidoglucano hidrolasas y diferentes bandas de actividad bacteriolíticas de 52 kDa fueron identificadas a partir de extracto SDS de células enteras, fracción y sobrenadante de esta cepa .

3.2 ZIMOGRAMA

En este trabajo el uso de un zimograma permitió asociar la posible actividad antimicrobiana con las bandas del SDS-PAGE (Fig 23) que corresponden a la bacteriocina y a la N-acetilmuramil-L-alanina amidasa. En la Fig 24 se muestra el zimograma de un gel de SDS al 15 % impregnado con *M. lysodenticus* que permitió observar una zona de inhibición correspondiente a la banda de 10 kDa en muestras de 24 y 48 h de sobrenadantes liofilizados de cultivos en APT con y sin sacarosa (20 %) pero no para la de 71.4 kDa. Este resultado permite comprobar la actividad antimicrobiana de la bacteriocina.

Cabe destacar que en la realización de un segundo zimograma (8%) se observan zonas de inhibición de *M. lysodenticus* debajo de la banda de 55 kDa con muestras de sobrenadantes liofilizados de cultivos en APT con sacarosa en de 24 y 48 h, aunque también se observa una zona de inhibición correspondiente a la banda de 70 kDa en muestras de sobrenadante correspondiente a las 24 h en

cultivos de APT con y sin sacarosa pero no en muestras de 48h. Este resultado sugiere que la actividad antimicrobiana correspondiente a la banda de 70 kDa se trata de la N-acetilmuramil-L-alanina amidasa, mientras que la banda cercana a 55 kDa no corresponde a ninguno de los productos de los genes que codifican para péptidos y proteínas con actividad antimicrobiana detectados en la anotación de la secuencia del genoma de la cepa P45.

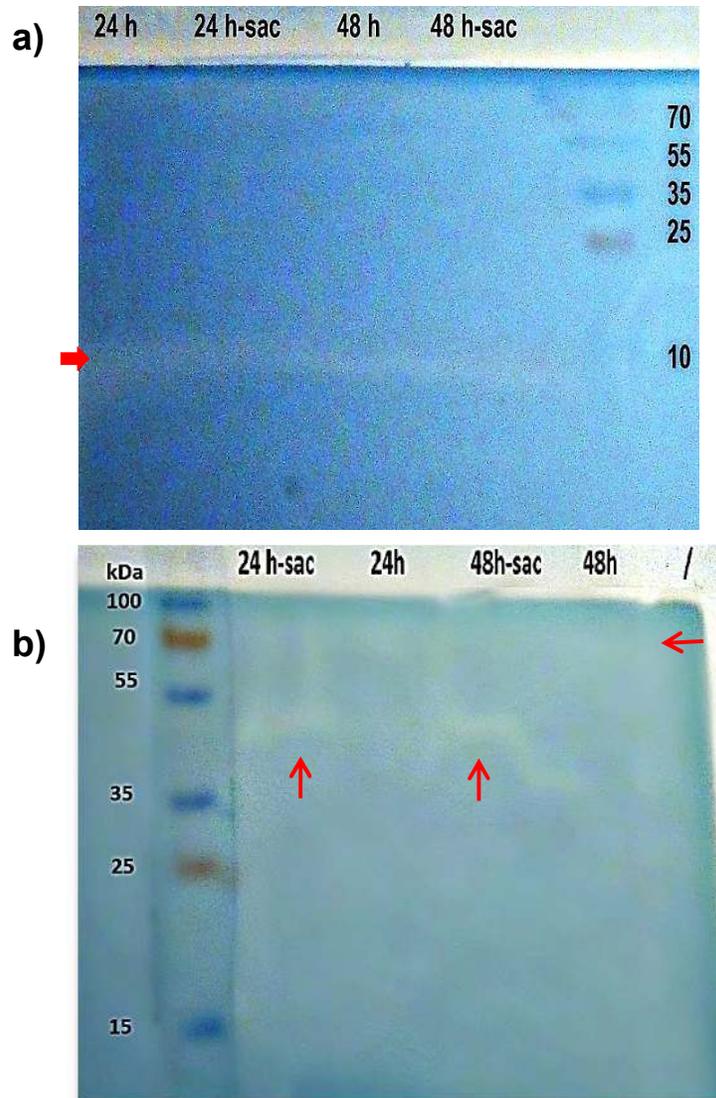


Fig 24 Zimograma a) (15% acrilamida) y b) (8% acrilamida) de actividad lítica de los sobrenadantes liofilizados producidos por la cepa P45 contra *M. lysodenticus*. (PageRuler™ Unstained Protein Ladder #SM0661 Fermentas). Las flechas rojas indica la zona de inhibición.

4. ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR IN VITRO

4.1.1 Ensayos de adherencia bacteriana de la cepa P45 contra células HEp-2 (Carcinoma faríngeo), Caco2 (adenocarcinoma colorrectal), HeLa(adenocarcinoma) y cáncer de colon(HT29).

Algunos de los efectos beneficiosos de los probióticos así como su posibilidad de colonizar transitoriamente el tracto gastrointestinal se ven favorecidos en el caso de presentar una buena capacidad de adhesión. Es por eso que se trata de un rasgo deseable en un probiótico potencial, pues prolonga el tiempo de residencia, favorece la exclusión de patógenos y la interacción con las células del hospedador, siendo esto último importante en la protección del epitelio y en la inmunomodulación. Los probióticos usan los mismos sitios de unión que los patógenos, compitiendo por la unión a la mucosa e impidiendo la invasión de la misma. La capacidad de inhibir la unión de patógenos o de desplazarlos es uno de los aspectos más importantes de la manipulación terapéutica de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos.

Como es difícil evaluar la adherencia bacteriana *in vivo*, se han desarrollado modelos *in vitro*, en particular con células del epitelio intestinal humano. Las líneas celulares que han sido utilizadas ampliamente son, HT-29 (presenta las funciones de las células secretoras de la mucosa) y Caco-2 (presenta la morfología y funciones de un enterocito). La capacidad adhesiva de *L. mesenteroides* P45 se estudió mediante el uso de células Hep-2 (laringe humana línea de carcinoma de células), Caco2 (adenocarcinoma colorrectal), HeLa (adenocarcinoma) y cáncer de colon (HT29).

La adherencia de la cepa LP45 contra las cuatro líneas celulares se probó bajo cuatro condiciones de crecimiento:

- APT
- APT+D-manosa,
- APT+sacarosa 20%
- APT+sacarosa 20% + D-manosa.

La cuantificación de la adhesión puede hacerse por métodos de cultivo, por conteo microscópico, por métodos de marcaje radioactivo o fluorescente e incluso mediante detección inmunológica. En este estudio se realizó una cuantificación microscópica en la que se consideraron 20 campos donde se contó el número de bacterias adheridas a cada célula. Este análisis visual de los fenotipos de adherencia de la cepa P45 (Fig 25-28) se compararon con los controles de *E.coli* 49766 y 2348 permitiendo así identificar los fenotipos de adherencia agregativa (en donde las bacterias se encuentran alrededor de la célula y/o núcleo, apilándose unas con otras) en los ensayos con las células HT-29, Caco-2 y HeLa en las líneas celulares y una adherencia localizada (las bacterias forman grupos de microcolonias en uno o varios puntos de la célula), en los ensayos con las células HEP-2.

La categorización de las células de acuerdo a Riveros et al., basada en la cantidad de bacterias adheridas como: cero bacterias por célula, de 1 a 50 bacterias por célula, de 50 a 100 bacterias por célula, >100 bacterias por célula, permitieron la observación de una adherencia leve (< 50 bacterias/célula) en las células HT-29 y HeLa y una adherencia moderada (>50 bacterias/célula) en las células Caco2 y Hep2. Estos resultados además indican que la habilidad de la cepa P45 varía entre las 4 líneas celulares, adhiriéndose mayoritariamente a Caco2 y Hep2 suplementados con D-manosa, ya que esta se une a los receptores de manosa localizados en la pared celular de la cepa P45. Mientras que en las líneas HT-29 y HeLa presentaron menor adherencia. Tal observación indica que estas bacterias presentan diferentes estructuras relacionadas con la adherencia y además de poder colonizar desde la faringe hasta el intestino. Algunas de las adhesinas y factores de adherencia proteicos asociados se identificaron con el análisis de la secuencia del genoma de la cepa P45, tales como:

- Proteína de unión a fibronectina (P45 Fibronectin/fibrinogen-binding protein)
- Proteína anclada a pared celular (P45 SasA -LPXTG-motif)
- Adhesina de superficie (>LP45. ABC-type metal ion transport system, periplasmic component/surface adhesin).

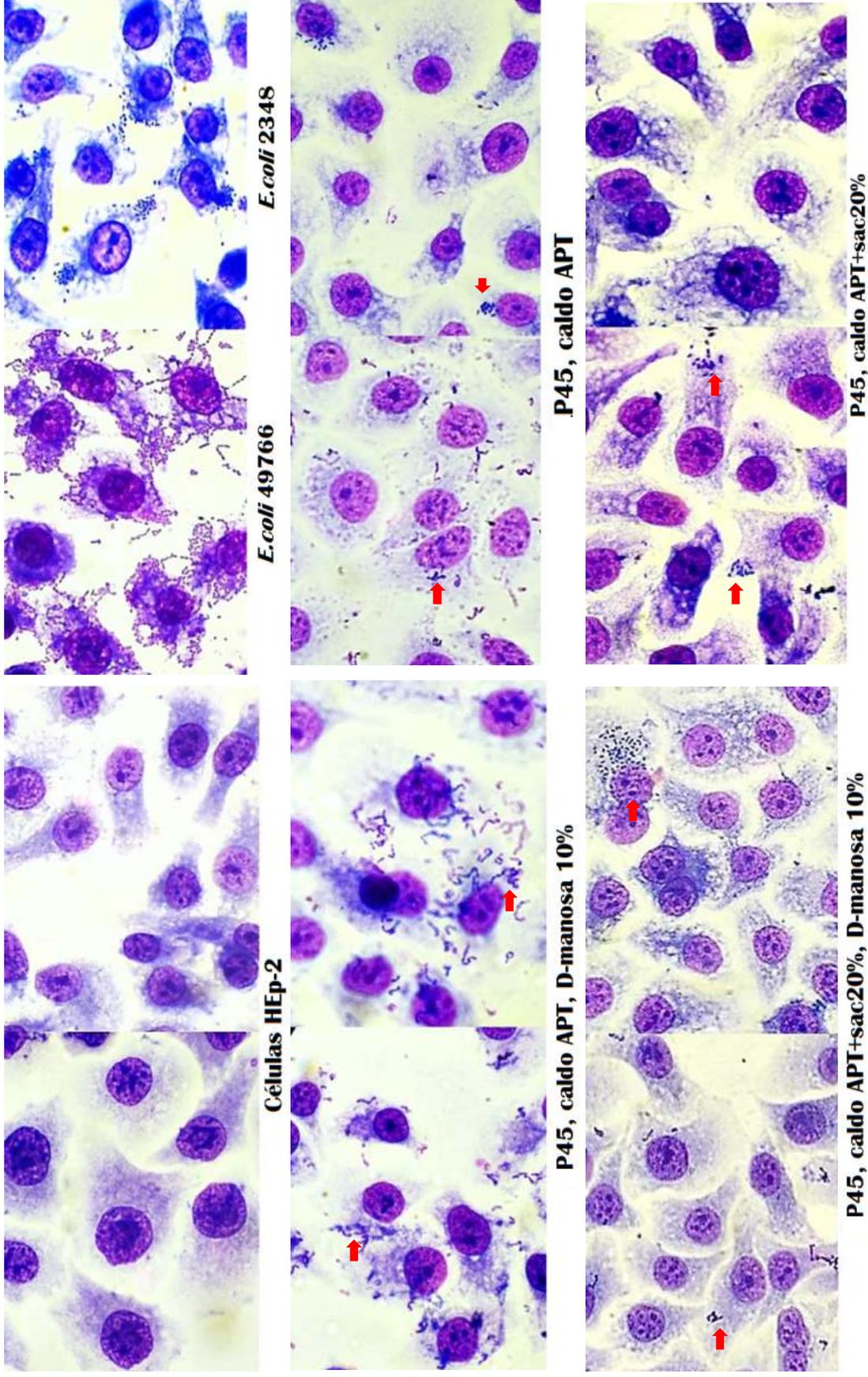


Fig 25. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HEP-2 (Carcinoma faríngeo). Las flechas rojas indican bacterias adheridas.

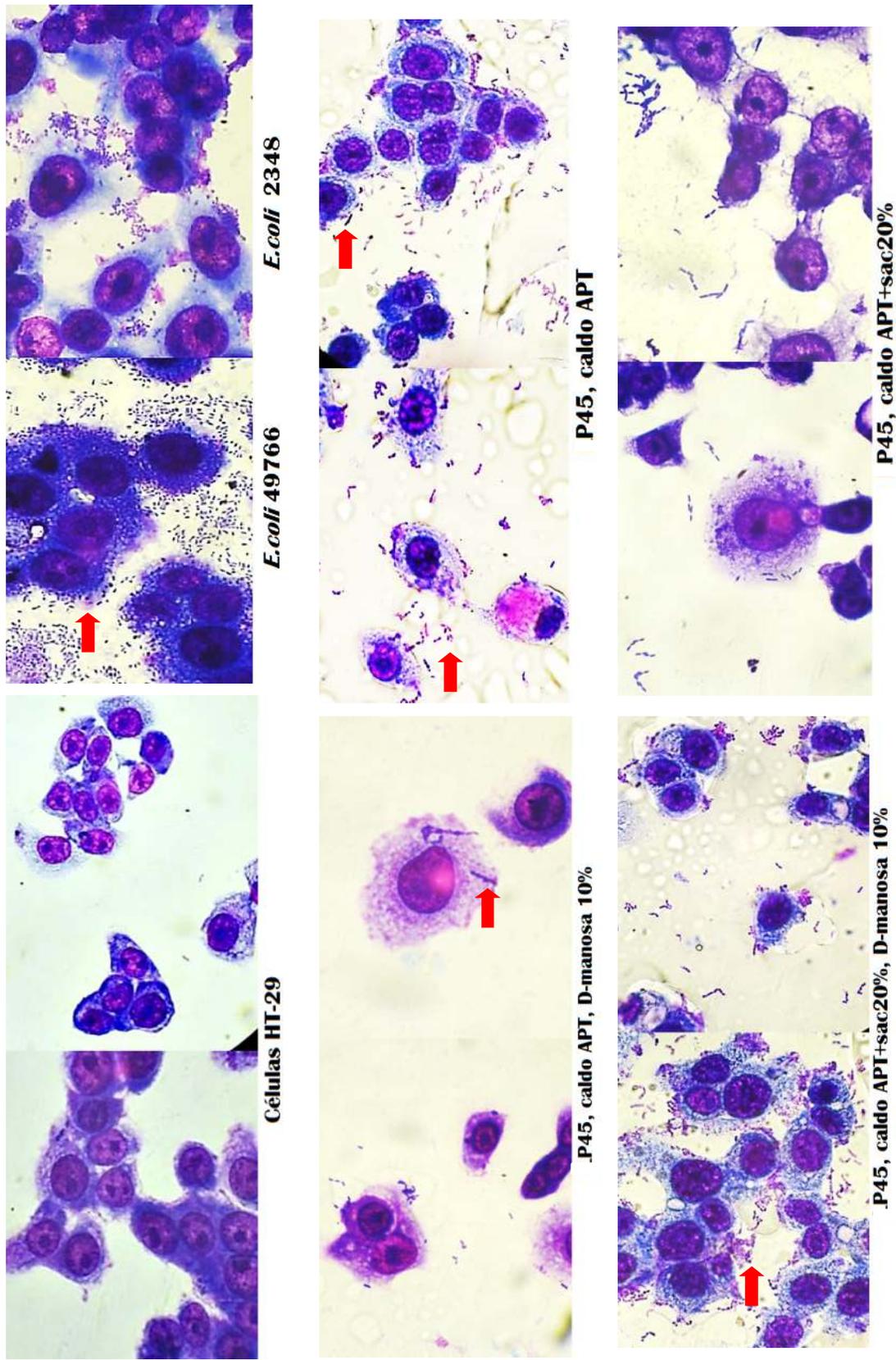


Fig 26. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HT-29 (Adenocarcinoma colonrectal). Las flechas rojas indican bacterias adheridas.

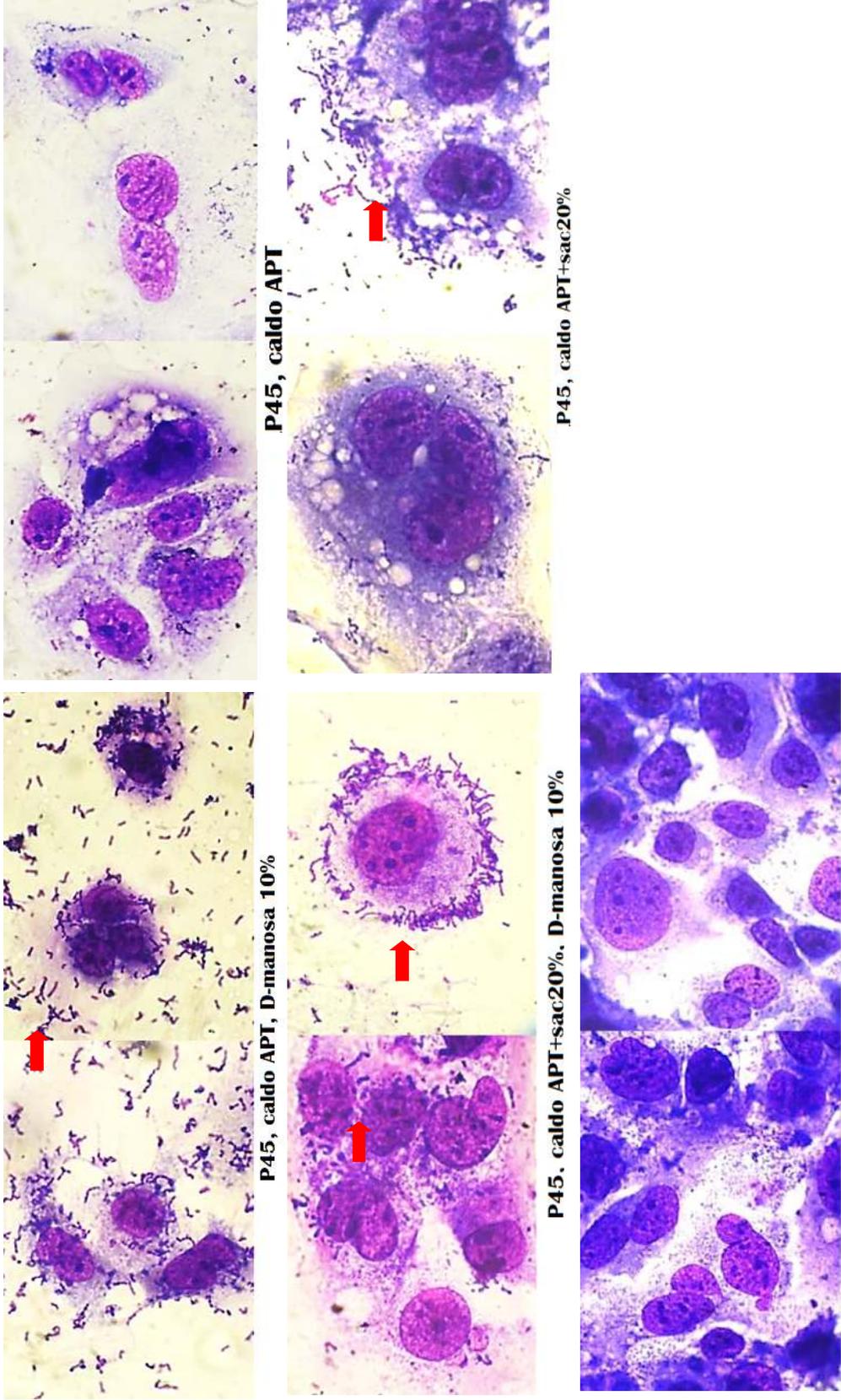


Fig 27. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio API y medio API+sac 20%) contra células Caco-2 (Adenocarcinoma colonrectal). Las flechas rojas indican bacterias adheridas.

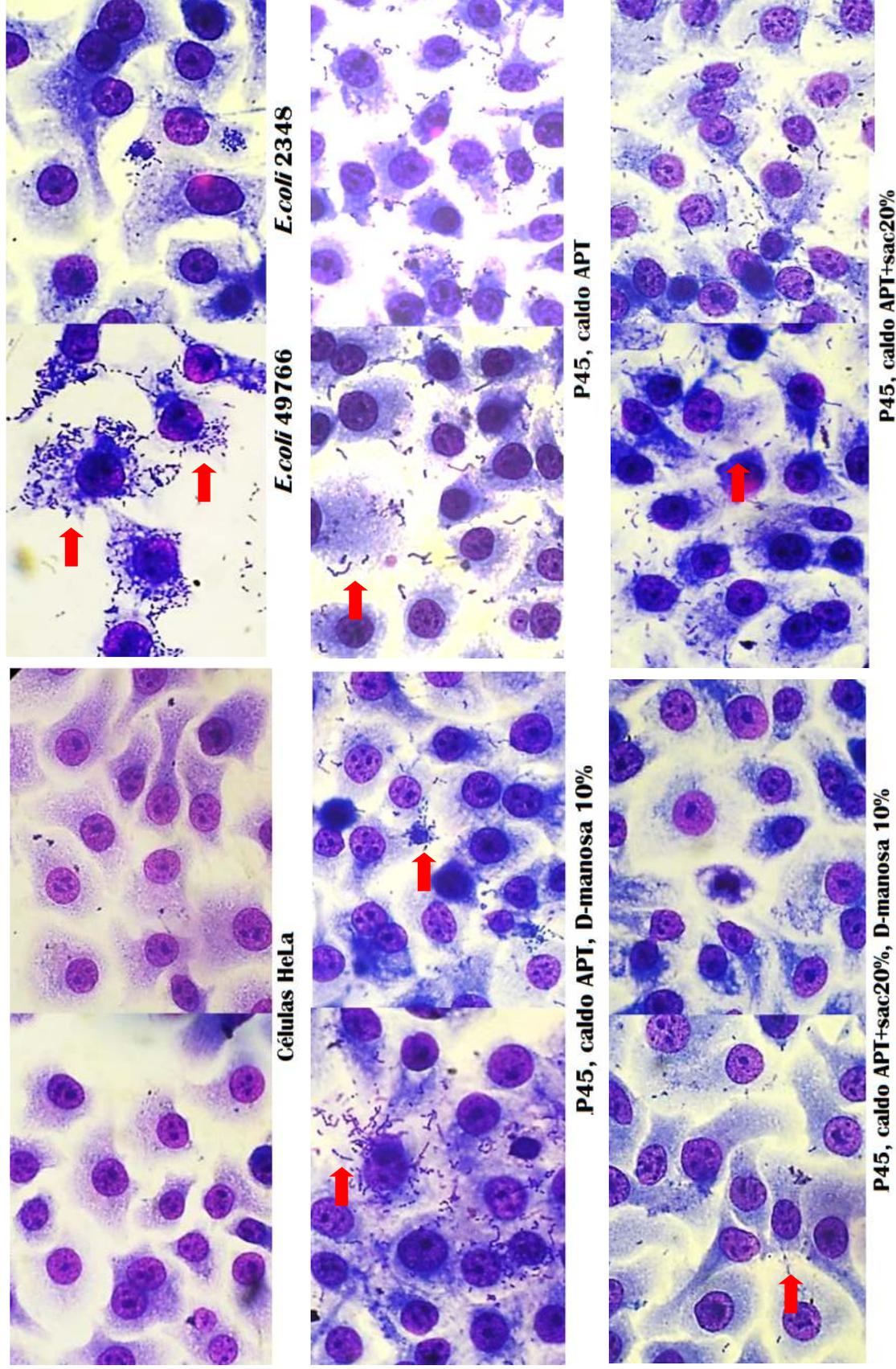


Fig 28. Ensayos de adherencia bacteriana de P45 (cultivados en medio APT y medio APT+sac 20%) contra células HeLa (Carcinoma de cervix). Las flechas rojas indican bacterias adheridas.

CONCLUSIONES

La cepa de *L. mesenteroides* P45 aislada del pulque posee una actividad bactericida contra *S. typhi*, *S. typhimurium*, *E. coli* y *L. monocytogenes*, determinada en ensayos antimicrobianos en placa. La producción de EPS (posiblemente una dextrana) a partir de sacarosa, mostró una capacidad mayor de inhibición del crecimiento de éstos patógenos.

El análisis de la anotación del genoma de la cepa P45 permitió detectar la presencia de genes que codifican para una prebacteriocina, una lisozima (1,4- β -N-acetylmuramidasa) y una peptidoglicano amidasa (N-acetylmuramoyl-L-alanina amidasa; murein_hidrolasa), proteínas con un tamaño de 11, 27 y 32 kDa, respectivamente. Esta información permitió dirigir la búsqueda de estas proteínas en fracciones de sobrenadante, pared celular y restos celulares.

Al evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes liofilizados y componentes celulares se observó una inhibición contra los patógenos, cuando la cepa se cultivó en presencia de sacarosa. Con los resultados inhibitorios de los zimogramas, se determinó que la inhibición se debe a péptidos con un tamaño (determinado por electroforesis en gel SDS-PAGE) de 10 kDa. Si se considera que la bacteriocina activa pierde una región de 38 aminoácidos, este tamaño corresponde al producto del gen identificado la anotación de la cepa P45 y que corresponde posiblemente a un no-lantibiótico, sin embargo son necesarias más pruebas confirmativas.

En cuanto a la adhesión celular *in vitro*, se probó contra las 4 líneas celulares (Caco2, Hep2, HT-29 y HeLa) presentando una adherencia moderada a las dos primeras líneas. Además, no hubo diferencias en cuanto a la adherencia de LP15 en comparación con la cepa de LP45 incubada con sacarosa.

REFERENCIAS

- Ananthaswamy Honnavara N. 2004. **Toxic effects of ultraviolet radiation.** *Toxicology and Applied Pharmacology.* 195:298-308
- Atanassova, M. Choiset, Y. Dalgalarondo, M. Chobert, JM. Dousset, X. 2003. **Isolation and partial biochemical characterization of a proteinaceous anti-bacteria and anti-yeast compound produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* strain M3.** *International Journal of Food Microbiology.* 83:63-73.
- Aucher Willy, Simonet Valérie, Fremaux Christophe. 2004. **Differences in two mesenteric secretion system from two *Leuconostoc* strains.** *FEMS Microbiology Letters.* 232:15-22.
- Bosscher, D., Breyneart, A., Pieters, L., Hermans, N. 2009. **Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects.** *Journal of Physiology and pharmacology.* 60:5–11.
- Chauviere, G., Coconnier, M., Kerneis, S., Fourniat, J., Servin A. L. 1992. **Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells.** *Journal of General Microbiology.* 138:1689–1696.
- Chellapandian M., Larios C., Sánchez González. 1998. **Production and properties of a dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* IBT-PQ isolated from ‘pulque’, a traditional Aztec alcoholic beverage.** *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology.* 21:51-56.
- Chung H-J & Yousef. 2005. ***Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin-like active against gram-negative pathogenic bacteria.** *Food Science and Technology.* 25(614):59-79.
- Cintas, Casaus, P. Hernández, P. E. 2000. **Lactic acid bacteria of food origin: taxonomic and phylogenetic considerations.** *Journal of Technology and Food Hygiene.* 38:61-70.
- Corsetti, A., Settanni, L., Van Sinderen, D. 2004. **Characterization of bacteriocin like inhibitory substances (BLIS) from sourdough lactic acid bacteria and evaluation of their *in vitro* and *in situ* activity.** *Journal of Applied Microbiology.* 96, 521–534.
- Cotter PD, Hill C. Ross RP. 2005. **Bacteriocins: developing innate immunity for food.** *Nature Reviews Microbiology.* 3:777-788.
- Courtney, H. S., Dale, J.B., Hasty, D.I. 1996. **Differential effects of the streptococcal fibronectin-binding protein, FBP54, on adhesion of group A streptococci to human buccal cells and HEp-2 tissue culture cells.** *Infection and Immunity.* 64:15–19.
- Del Moral Marti, Moreno Aliaga, Martínez Hernández. 2003. **Efecto de los prebióticos sobre el metabolismo lipídico.** *Nutrición Hospitalaria.* 4:81-88
- Dunn, K., Dicksterin, R., Feinbaum, R., Burnett, B.K. 1988. **Developmental regulation of nodule-specific genes in alfalfa root nodules.** *Molecular Plant Microbe Interactions.* 1:66-74
- Iguchi, A., Thomson, 2009. **Complete genome sequence and comparative genome analysis of Enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69.** *Journal of Bacteriology.* 191:347–354.

- Endo Akihito and Sanae Okada. 2008. **Reclassification of the genus *Leuconostoc* and proposals of *Fructobacillus fructosus* gen. nov., *Fructobacillus durionis* comb. nov., *Fructobacillus ficulneus* comb. nov. and *Fructobacillus pseudoficulneus* comb. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 58:2195-2205
- Escalante, A., 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.
- Fraga Vidal, Moulis Claire, Ecalier Pierre. 2011. **Isolation of a gene from *Leuconostoc citreum* B/110-1-2 encoding a novel dextransucrase enzyme.** *Current Microbiology*. 62:1260-1266.
- Gareau Mélanie, Sherman Philip, and Walker W. Allan. 2010. **Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease.** *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 7:503–514
- James, J. M., Loessner, M. J., and Golden, D.A. 2005. **Modern food microbiology.** 7th Edition. Springer. New York. 790
- Johansson, P., Paulin, L., Sade, E. 2011. **Genome sequence of a food spoilage lactic acid bacterium, *Leuconostoc gasicomitatum* LMG 18811T, in association with specific spoilage reactions.** *Applied and Environmental Microbiology*. 77:4344–4351.
- Petre Marian. 2012. **Advances in applied biotechnology.** 1st Edition. InTech. Croatia. 63-95 Chapter 4: Fermentation Processes Using Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocins.
- Lappan Fogler. 1994. ***Leuconostoc mesenteroides* growth kinetics with application to bacterial profile modification.** *Biotechnology and Bioengineering*. 43:865-873.
- López M. 2008. **Bacteriocins of Gram positive bacteria: a potential source of new biomedical treatments.** *Mexican Journal of Pharmaceutical Sciences*. 39:49-57.
- Makarova, K.S., Koonin, E.V. 2007. **Evolutionary genomics of lactic acid bacteria.** *Journal of Bacteriology*. 189:1199–1208.
- Mendez Vilas A. 2010. **Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology.** 1st Edition. Formatex. Badajoz, Spain. 463-472
- Nes, I. F., and O. Johnsborg. 2004. **Exploration of antimicrobial potential in LAB by genomics.** *Current Opinion in Biotechnology*. 15:100–104.
- Marshall, E. and [unreadable] 2011. **Traditional fermented food and beverages for improved livelihoods.** FAO Diversification booklet Number 21. Rome, Italy.
- McDougald Diane, Rice Scott A., Barraund Nicolas. 2011. **Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal.** *Nature Reviews Microbiology*. 28:39-50
- Mendoza, F., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, Valdivia, E. 1999. **Antilisterial activity of peptide AS-48 and study of changes induced in the cell envelope properties of an AS-48-adapted strain of *Listeria monocytogenes*.** *Applied and Environmental Microbiology*. 65:618-662.

- Mota-Meira, M. LaPointe, G. Lacroix. 2000. **MICs of mutacin B-Ny266, nisina A, vancomycin, and ozacillin against bacterial pathogens.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1: 24-29
- Ohland, C.L., MacNaughton, W.K. 2010. **Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function.** *AJP Gastrointestinal and Liver Physiology*. 298:807–819.
- O’Hara Ann, Shanahan Fergus. 2006. **The gut flora as forgotten organ.** *EMBO reports*. 7:88-93.
- Ouwehand, A. C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., Salminen, S. 1999. **Probiotics: mechanisms and established effects.** *International Dairy Journal*. 9:43–52.
- Piard J.C., Desmazeaud M. 1991. **Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products.** *Le Lait Dairy Science and Technology*. 71:525-541.
- Poolman, B. 1993. **Energy transduction in lactic acid bacteria.** *FEMS Microbiology Reviews*.12:125-148
- Prakash Tamang & Kasipathy Kailasapathy. 2010. **Fermented foods and beverages of the world.** 1st Edition. CRC Press. Florida U.S. 41-85
- Riveros, M., Barletta, F., Cabello, M., Durand, D., Mercado, E.H., Contreras, C., Rivera, F.P., Mosquito, S., Lluque, Á., Ochoa, T.J. 2011. **Patterns of adherence of diffusely adherent strains of *Escherichia coli* (DAEC) from children with and without diarrhea.** *Journal of Experimental Medicine and Public Health*. 8:21–28.
- Salminen, M.K. H. Rautelin, S. Tynkkynen, T. Poussa, M. Saxelin, V. Valtonen, A. Järvinen. 2004. ***Lactobacillus* bacteremia, clinical significance and patient outcome, with special focus on probiotic *L. rhamnosus* GG.** *Clinical Infectious Diseases*. 38:62-69.
- Segul Irwin H. 1976. **Biochemical Calculations. How to solve mathematical Problems in General Biochemistry.** 2nd Edition. Hamilton Printing. California U.S. 400
- Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Roy, N.C. 2013. **The role of cell surface architecture of in host microbe interactions in the gastrointestinal tract.** *Mediators of Inflammation*. 2013:1–16.
- Steinkraus, K.H. 2002. **Fermentations in world food processing.** *Reviews in Food Science and Food Safety*. 1:23–32.
- Suda, Y., Tanaka, T., Komatsuzawa, H. 2013. ***Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to the salivary agglutinin gp340, derived from human saliva.** *Infection and Immunity*. 81:1870–1879.
- Rosales, M.S.D., Jiménez, M. de la L.G., Gómez, C.R., Valles, C.Q., de León, S.D.D., Ordaz, S.J.M., Balch, E.P.M. 2008. **In vitro culture as a tool for the development, improvement and conservation of species of *Agave*.** *Research and Science*. 16:53–62.
- Stiles M. E. 1996. **Biopreservation by lactic acid bacteria.** *Leuvenhoek*.70:331–345.
- Torres, A.G., Zhou, X., Kaper, J.B. 2005. **Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells.** *Infection and Immunity*. 73:18–29.

Vidal, J.E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., Navarro-García. 2007. **Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli***. Public Health of Mexico. 49:376–386.

Wood, B. & Warner. 2003. **Genetics of lactic acid bacteria**. 1st Edition. Springer. New York, U.S. 95-121

ANEXOS

ANEXO I

Medio APT Difco™ (Fórmula aproximada por litro)	
Extracto de levadura	7,5 g
Hidrolizado pancreático de caseína	12,5 g
Glucosa	10,0 g
Citrato de sodio	5,0 g
Clorhidrato de tiamina	1,0 mg
Cloruro de Sodio	5,0 g
Fosfato dipotásico	5,0 g
Cloruro de manganeso	0,14 g
Sulfato de magnesio	0,8 g
Sulfato Ferroso	0,04 g
Polisorbato 80	0,2 g

ENSAYO DE ADHESIÓN CELULAR *in vitro*

Solución PUKS	
NaCl	8g
KCl	0.40g
NaHCO ₃	0.35g
EDTA	0.34g
Agua MQ	1000 mL
(Esterilizar, autoclave)	

Solución PBS	
KCl	0.20g
Fosfato de sodio dibásico	1.15g
Fosfato de potasio monobásico	0.20g
NaCl (8g)/ 800mL agua destilada	
Aforar a 1000 mL	
Ajustar pH 7.2	
(Esterilizar, autoclave)	

ANEXO II. PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SÓLIDO

(Cálculos Bioquímicos. Segunda edición. Irwin H. Segel)

Concentración final de sulfato de amonio -% de saturación a 0°C

	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100	
Sulfato de amonio (g) necesario adicionar a 100 mL de solución																		
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7	
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2	
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7	
15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2	
20	0.0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7	
25		0.0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2	
30			0.0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8	
35				0.0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3	
40					0.0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8	
45						0.0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3	
50								3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8	
55								0.0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3	
60									0.0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9	
65										0.0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4	
70											0.0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9	
75												0.0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4	
80													0.0	3.3	6.7	10.3	13.9	
85														0.0	3.4	6.8	10.5	
90															0.0	3.4	7.0	
95																0.0	3.5	
100																	0.0	

Nota: El pH de la solución puede descender con la adición del sulfato de amonio. En el cuadro se marca los gramos de Sulfato de amonio empleado

ANEXO III. SDS-PAGE

GEL SEPARADOR	5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	30 mL	50 mL
6 % Acrilamida						
H ₂ O (mL)	2.3	5.3	8	10.6	15.9	26.5
30% Mix Acrilamida ^a (mL)	1.3	2	3	4	6	10
1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	1.3	2.5	3.8	5	7.5	12.5
10 % SDS ^b (μL)	50	100	150	200	300	500
10 % APS ^c (μL)	50	100	150	200	300	500
TEMED ^d (μL)	3	8	12	16	24	40
8 % Acrilamida						
H ₂ O (mL)	2	4.6	7	9.3	13.9	23.2
30% Mix Acrilamida (mL)	1.7	2.7	4	5.3	8	13.4
1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	1.3	2.5	3.8	5	7.5	12.5
10 % SDS (μL)	50	100	150	200	300	500
10 % APS (μL)	50	100	150	200	300	500
TEMED (μL)	2	6	9	12	18	30
10 % Acrilamida						
H ₂ O (mL)	1.7	4	5.9	7.9	11.9	20
30% Mix Acrilamida (mL)	2	3.3	5	6.7	10	16.6
1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	1.3	2.5	3.8	5	7.5	12.5
10 % SDS (μL)	50	100	150	200	300	500
10 % APS (μL)	50	100	150	200	300	500
TEMED (μL)	2	4	6	8	12	20
12 % Acrilamida						
H ₂ O (mL)	1.7	3.3	5	6.6	9.9	16.4
30% Mix Acrilamida (mL)	2	4	6	8	12	20
1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	1.3	2.5	3.8	5	7.5	12.5
10 % SDS (μL)	50	100	150	200	300	500
10 % APS (μL)	50	100	150	200	300	500
TEMED (μL)	2	4	6	8	12	20
15 % Acrilamida						
H ₂ O (mL)	1.2	2.3	3.5	4.6	6.9	11.4
30% Mix Acrilamida (mL)	2.5	5	7.5	10	25	25
1.5 M Tris (pH 8.8) (mL)	1.3	2.5	3.8	5	7.5	12.5
10 % SDS (μL)	50	100	150	200	300	500
10 % APS (μL)	50	100	150	200	300	500
TEMED (μL)	2	4	6	8	12	20

GEL CONCENTRADOR	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	6 mL	10 mL
H ₂ O (mL)	0.68	1.4	2.1	2.7	4.1	6.8
30% Mix Acrilamida (mL)	0.17	0.33	0.5	0.67	1	1.7
1.5 M Tris (pH 6.8) (mL)	0.13	0.25	0.38	0.5	0.75	1.25
10 % SDS (μL)	10	20	30	40	60	100
10 % APS (μL)	10	20	30	40	60	100
TEMED (μL)	1	2	3	4	6	10

^a Comúnmente 29.2% de acrilamida y 0.8% N,N'-Metilen Bisacrilamida. ^b Dodecil sulfato de sodio ^c Persulfato de amonio. ^d N,N,N',N'-Tetrametiletildiamina