



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biotecnología

Evaluación de la actividad probiótica y antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de un producto lácteo artesanal.

TESIS PROFESIONAL

Para obtener el grado de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

YAZMIN PÉREZ MEZA

DIRECTOR DE TESIS

Dra. PAOLA HERNÁNDEZ CARRANZA

CO- DIRECTOR DE TESIS

Dra. IVONNE PÉREZ XOCHIPA

Noviembre 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por toda su ayuda, apoyo y motivación desde el primer momento que nos sentamos a discutir mi futuro profesional y que carrera iba a escoger. Por todo su esfuerzo brindado para poder hoy concluir mis estudios. Gracias por enseñarme que puedo lograr cada cosa que me proponga, por enseñarme a ser fuerte y determinante ante cualquier decisión que tome, que mientras nuestra familia este unida ningún problema podrá derribarnos, por su comprensión y tolerancia a mi persona. A no dejarme rendir ante las inclemencias de la vida.

Agradezco a mi hermana Maritza por todo su apoyo durante mi estancia en la universidad, ofreciéndome lo que estuviera al alcance de sus manos. Por sus explicaciones en temas que no entendía de química, pero sobre todo te agradezco por ser el ejemplo a seguir de la familia, la primera en mostrarnos que si te lo propones puedes conseguir todo lo que planeas y alcanzar tus metas.

Agradezco a mi directora la Doctora Paola Hernández Carranza, no tengo como agradecerle todo su apoyo y enseñanzas, por toda la tolerancia que me tuvo en este proyecto y que nunca me dejó sola, por todo el aprendizaje, que costó muchas llamadas de atención, siempre con el propósito de mejorar mi desempeño. Agradezco toda la confianza que me brindó, por sus palabras de apoyo en momentos que me marcaron mucho y por todos esos consejos de vida que sin duda me ayudaron y no cambiaría por nada.

Agradezco a mis amigos que hice y conocí durante la universidad, a mis compañeros que conocí durante mi estancia en el laboratorio, por sus consejos y ayuda durante la realización de mi proyecto, a Yamil, Mariana, Ángel, Fernanda, Laura y Monse que en poco tiempo de conocerme me brindaron su amistad, y a los docentes que se encontraban en el laboratorio, por incluirme en los convivios y las salidas por alitas.

Pero sobre todo quiero agradecerle a Ramón y Cesar, sin ustedes mi estancia en la universidad no hubiera sido tan genial, Rami gracias por tus asesorías, por compartirme de tu comida todos los días, pero sobre todo, por tus consejos tan directos. Gracias Cesar por abrirme las puertas de tu casa y hacerme sentir que tenía un segundo hogar en Puebla. Gracias por ser mis mejores amigos.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1.1. Bacterias ácido lácticas	3
1.1.1. Generalidades	3
1.1.2. Metabolitos producidos por bacterias ácido lácticas	4
1.1.2.1 Ácido láctico	4
1.1.2.2 Ácido cítrico	5
1.1.2.3 Peróxido de hidrogeno.....	5
1.1.2.4 Bacteriocinas	5
1.2 <i>Lactococcus lactis</i>	8
1.3 Probióticos.....	9
1.4 Bacterias patógenas presentes en alimentos.....	10
1.6 Modelos de simulación gastrointestinal.....	13
2. JUSTIFICACIÓN.....	16
3. OBJETIVOS	17
3.1. Objetivo general.....	17
3.2. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
4. DIAGRAMA DE TRABAJO	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1. Reactivación y conservación microorganismos.....	20
5.2. Análisis del potencial probiótico	20
5.2.1. Efecto del pH.....	21
5.2.2. Efecto del cloruro de sodio	21
5.2.3. Efecto de los azúcares	21
5.2.4. Efecto de sales biliares.....	21
5.2.5. Efecto de la simulación gastrointestinal	22
5.3. Análisis del potencial antimicrobiano	22
5.3.1. Obtención de sobrenadantes de <i>Lactococcus lactis</i> subsp <i>lactis</i>	22
5.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes.....	23
5.4. Electroforesis de proteínas	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	24

6.1.	Análisis del potencial probiótico	24
6.1.1.	Efecto del pH.....	24
6.1.2.	Efecto de solutos (cloruro de sodio y fuentes de carbono).....	25
6.1.3.	Efecto de sales biliares.....	27
6.1.4.	Efecto de la simulación gastrointestinal	28
6.2.	Análisis del potencial antimicrobiano	28
6.2.1.	Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes frente a bacterias patógenas 28	
6.2.2.	Electroforesis del sobrenadante.....	30
7.	Bibliografía.....	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Equipos utilizados en la investigación.	18
Tabla 2. Métodos utilizados en la investigación.	18
Tabla 3. Formulación de agar infusión cerebro corazón (BHI).	23
Tabla 4. Evaluación de actividad de compuestos antimicrobianos (sobrenadante) contra bacterias patógenas.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de ácido láctico.....	5
Figura 2.Estructura química de la nisina.	7
Figura 3. Partes del tracto gastrointestinal.....	14
Figura 4. Efecto del pH sobre la población de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> durante un periodo de 3 h.....	25
Figura 5. Efecto carbohidratos (A) y concentración de cloruro de sodio (B) sobre el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	26
Figura 6. Efecto de adición de sales biliares en el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i>	27
Figura 7. Halo de inhibición contra <i>Staphylococcus aureus</i> (izquierda) y contra <i>Salmonella Typhimurium</i> (derecha).	30
Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida del sobrenadante producido por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	31

RESUMEN

Lactococcus lactis es una bacteria ácido láctica de gran importancia para el desarrollo de alimentos funcionales, hoy en día su adición en alimentos contribuye otorgando características sensoriales en productos lácteos, sin embargo, es necesario realizar pruebas que avalen otras aplicaciones potenciales con la finalidad de otorgar valor agregado a los alimentos que lo contienen. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad probiótica y antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de queso adobera. La actividad probiótica se determinó evaluando la resistencia del microorganismo a diferentes valores de pH, concentración de NaCl, sales biliares y supervivencia al proceso de simulación gastrointestinal. Por otro lado, la actividad antimicrobiana se evaluó mediante la técnica de difusión de agar contra *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*. Los resultados mostraron que *Lactococcus lactis* se redujo entre 1 y 2 ciclos logarítmicos en las pruebas de pH y resistencia gástrica, mientras que en NaCl se presentó un ligero aumento de la población a concentraciones de 1 y 2%. Además, es capaz de mantenerse viable durante el proceso de simulación gastrointestinal. Respecto a la actividad antimicrobiana *L. lactis* es capaz de actuar como antimicrobiano disminuyendo la población de ambas bacterias patógenas, generando un halo de inhibición de 1.5 cm en *Salmonella* Typhimurium. Por lo que, *Lactococcus lactis* puede ser empleado en alimentos para actuar como antimicrobiano o probiótico.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, la prevención de enfermedades transmitidas por alimentos ha generado gran interés entre la comunidad científica, además, día a día se identifican más microorganismos responsables de estas enfermedades. Por lo cual, las investigaciones se han centrado en buscar alternativas seguras, dirigidas principalmente al uso de antimicrobianos naturales. En este sentido, el grupo de bacterias ácido lácticas (BAL) ha llamado la atención, estos microorganismos son ampliamente utilizados en la industria alimentaria donde producen múltiples beneficios, actualmente se utilizan como microorganismos probióticos, así como antimicrobianos que contribuyen en la conservación de alimentos (Stoyanova *et al.*, 2012).

Por otro lado, el estudio de productos lácteos elaborados artesanalmente como el queso adobera, son desde hace un tiempo objeto de estudio, debido a que contienen BAL que otorgan características sensoriales al producto, la existencia de estos microorganismos resulta benéfico tanto para el alimento como para los consumidores debido a que proporcionan una gran variedad de efectos a nivel gastrointestinal (Vázquez *et al.*, 2009). Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad probiótica y antimicrobiana de una bacteria láctica aislada de queso adobera artesanal.

1. ANTECEDENTES

1.1. Bacterias ácido lácticas

1.1.1. Generalidades

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se definen como microorganismos Gram positivos, muy heterogéneos desde el punto de vista morfológico y fisiológico, presentan forma de cocos o bacilos, no móviles, no esporulados, no pigmentados, catalasa negativa y anaerobios facultativos. Producen principalmente ácido láctico como producto de su metabolismo fermentativo de carbohidratos, principalmente lactosa (Monroy *et al.*, 2009). En este sentido, se clasifican en homofermentativas y heterofermentativas (Rodríguez, 2011), las bacterias homofermentativas producen ácido láctico como principal producto de la fermentación, mientras que las heterofermentativas producen una serie de metabolitos además de ácido láctico, entre los cuales se encuentran: dióxido de carbono, ácido acético y etanol. Por otro lado, se pueden clasificar respecto a la temperatura de crecimiento, generalmente se clasifican en mesófilas con una temperatura óptima de crecimiento entre 20 y 25°C y en termófilas con una temperatura de 40 a 45°C (Carr *et al.*, 2002).

Dentro de los rasgos fisiológicos más característicos de las BAL destaca su tolerancia al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo, lo cual les ofrece una gran ventaja selectiva para desarrollarse en los hábitats donde se encuentran (Monroy *et al.*, 2009), soportando niveles de pH tan bajos como lo hace el género *Lactobacillus* que crece a valores de pH de 4.0, o incluso menores. Sin embargo, la mayoría de las BAL crece a pH entre 4 y 4.5, permitiéndoles sobrevivir naturalmente en medios donde otras bacterias no tolerarían estas condiciones (Cabeza-Herrera, 2006).

Respecto a su hábitat algunas BAL se localizan frecuentemente en ambientes ricos en nutrientes caracterizados por la presencia de carbohidratos y productos de la degradación de proteínas y vitaminas, por lo que pueden encontrarse en productos como leche, derivados lácteos, cárnicos, vegetales fermentados, frutas, hortalizas

frescas, ensilados, pescado y derivados de la pesca. Además forman parte de la microbiota del cuerpo tanto de animales como de humanos, encontrándose en los tractos respiratorio, intestinal y genitourinario, donde ejercen un papel benéfico ya que antagonizan la colonización de patógenos, mejoran la digestibilidad de ciertos alimentos y actúan como coadyuvantes inmunológicos (Monroy *et al.*, 2009).

Actualmente, el grupo de las BAL comprende microorganismos de los siguientes géneros: *Aerococcus*, *Alloinococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulun*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Carr *et al.*, 2002).

1.1.2. Metabolitos producidos por bacterias ácido lácticas

Las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria como cultivos iniciadores para la obtención de productos fermentados, donde producen cambios estructurales y sensoriales (sabor, olor y textura) que aumentan el valor añadido de la materia prima (Cesa, 2016). Las BAL producen una serie de metabolitos, algunos de estos se han empleado como conservadores naturales por su capacidad para controlar el crecimiento de bacterias patógenas o deteriorativas de los alimentos, algunos de los metabolitos se describen a continuación:

1.1.2.1 Ácido láctico

Esta presenta en muchos alimentos de forma natural o como producto de la fermentación microbiana *in situ*, algunos alimentos donde se encuentra este ácido son: aceitunas y encurtidos de hortalizas, yogurt, suero de leche, queso, panes de masa fermentada etc. Se utiliza como acidulante, saborizante, agente tampón de pH y como inhibidor de deterioro bacteriano en alimentos como dulces, pan o productos de panadería, bebidas no alcohólicas, sopas, sorbetes, mermeladas, gelatinas y mayonesas. El mecanismo de inhibición de este ácido esta probablemente relacionado con su solubilidad, lo que produce afectaciones en la

membrana citoplasmática de los microorganismos, acidificación y disminución de la energía disponible para que las células bacterianas puedan crecer (Maldonado, 2016; Parra, 2010). La figura 1 presenta la estructura de este metabolito.

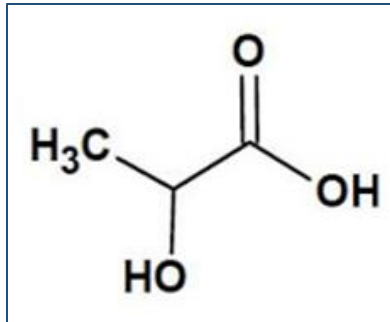


Figura 1. Estructura química de ácido láctico. Tomado de: Parra, 2010.

1.1.2.2 Ácido cítrico

Este metabolito es producido por bacterias heterofermentativas, utilizadas en la elaboración de mantequilla o queso, donde transforman el ácido cítrico producido en productos aromatizantes como la acetoina y el diacetilo, este metabolito aparte de impartir aroma y sabor a los productos lácteos ejerce un efecto antimicrobiano. El acetaldehído puede inhibir la división celular de *Escherichia coli*, mientras que el diacetilo inhibe levaduras, bacterias Gram negativas y Gram positivas (Parra,2010).

1.1.2.3 Peróxido de hidrogeno

Es metabólicamente producido por el género *Lactococcus* a través de la acción de la enzima NADH oxidasa, la cual cataliza la oxidación de NADH por oxígeno molecular. Es un antimicrobiano natural que se encuentra en la leche y queso cottage, inhibe microorganismos como *Pseudomona* y *Staphylococcus aureus* (Parra, 2010).

1.1.2.4 Bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como metabolitos secundarios de las BAL, son péptidos activos con propiedades bactericidas, fungicidas y actuar contra algunos

parásitos, estas sustancias con frecuencia actúan frente a otras bacterias, con el fin de ganar dominio en el nicho ecológico en el que se desarrollan, jugando un papel fundamental en la dinámica de la población bacteriana (Muñoz, 2003). De acuerdo con Chen y Hoover (2003) las bacteriocinas son metabolitos derivados de la síntesis ribosómica, conformados por péptidos entre 20 y 60 aminoácidos (lactococinas A, B, M y G, lactacina B y helveticina J, entre otras). Son secretados extracelularmente y presentan una alta actividad bactericida o bacteriostática sobre microorganismos patógenos y deteriorativos de alimentos. Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter *et al.*, 2005).

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida. Entre sus características principales destacan el ser estables al calor y a pH ácidos, ambas propiedades están estrechamente relacionadas: es decir, un incremento de pH reduce la estabilidad al calor (Chen y Hoover, 2003). Sin embargo, aunque las bacteriocinas presentan estabilidad a pH ácido o neutro, son fácilmente destruidas a pH mayor de 10 (Jack *et al.*, 1995). La alta termorresistencia en las bacteriocinas con peso molecular menor a 5 kDa, les permite mantener su actividad después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche, pero son parcialmente destruidas por arriba de los 100°C. Dicha estabilidad puede deberse a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones hidrofóbicas, así como a la formación de enlaces cruzados estables (Alquicira, 2006).

La identificación de bacteriocinas por parte de BAL comenzó en 1928, cuando se describió que ciertas cepas de *Lactococcus* empleadas en la fabricación de quesos producían un efecto inhibitorio contra algunas bacterias patógenas y nocivas, generando la conservación del queso, posteriormente en 1933 se describió por primera vez una sustancia de naturaleza peptídica con actividad antimicrobiana producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* que posteriormente se denominó nisina (Monroy *et al.*, 2009), siendo hoy en día el lantibiótico más conocido y mejor caracterizado, que es descrito como un péptido de 34 aminoácidos

de bajo peso molecular menor a 5 kDa (Song *et al.*, 2017), en la actualidad, la nisina es la única bacteriocina aprobada por la FDA (Administración de Drogas y Alimentos) para incluirse en alimentos, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos.

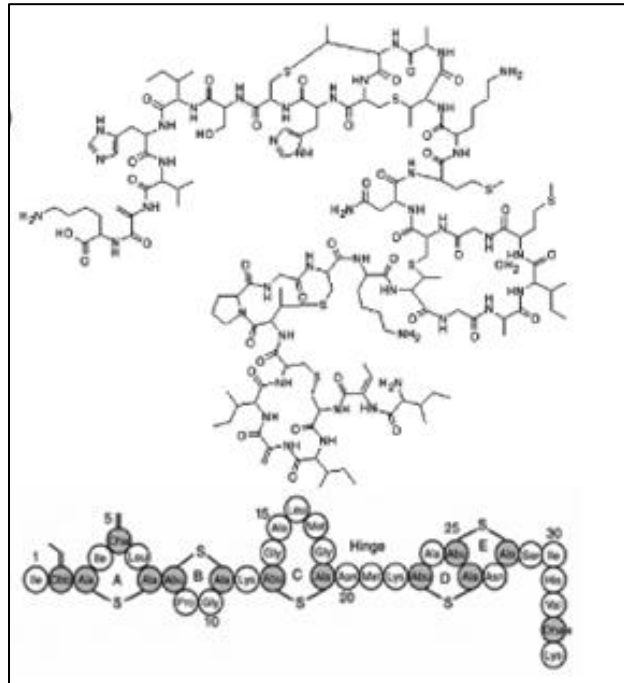


Figura 2. Estructura química de la nisina. Tomado de: Song *et al.*, 2017

1.1.2.4.1. Actividad antimicrobiana y modo de acción de las bacteriocinas

De acuerdo con 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:

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

1.2 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis es una bacteria Gram positiva, no móvil, catalasa negativa, no esporulada, son cocos de 1.2-1.5 µm de diámetro con forma de cadenas variables, con metabolismo homofermentativo, produce exclusivamente ácido láctico (Maldonado, 2016). Esta especie se divide en cuatro subespecies: *L. lactis* subsp. cremoris, *L. lactis* subsp. hordniae, *L. lactis* subsp. tructae y *L. lactis* subsp. lactis (Song *et al.*, 2017). *Lactococcus lactis* se utiliza comúnmente como un cultivo iniciador para la fabricación de queso, yogurt y kéfir entre otros productos lácteos. La actividad metabólica de *Lactococcus lactis* determina el pH, textura, sabor y otras características sensoriales de los productos (Smit *et al.*, 2005). Los cultivos iniciadores están expuestos a diversos cambios fisicoquímicos a lo largo de la producción de alimentos, incluyendo estrés ácido, oxidativo y osmótico que afectan su actividad metabólica y, por tanto, pueden influir en la calidad de estos (Bachmann *et al.*, 2010).

Dentro de la clasificación de *Lactococcus lactis* encontramos dos subespecies importantes: *Lactococcus* subsp. cremoris y *Lactococcus lactis* subsp. lactis que la principal diferencia es que *L. lactis* subsp. lactis generalmente son fuertes y menos propensos a ser afectados por cambios en el medio ambiente, mientras que *L. lactis* subsp. cremoris generalmente son frágiles y sensibles a los cambios en el medio ambiente. Por ejemplo, *L. lactis* subsp. lactis pueden crecer a 40 °C, a pH de hasta 9.2, así como en presencia de NaCl al 3 %, mientras que *L. lactis* subsp. cremoris no pueden crecer bajo ninguna de estas condiciones (Gallegos *et al.*, 2017).

1.2.1 *Lactococcus lactis* subsp. lactis y su aplicación en alimentos

Lactococcus lactis subsp. lactis (conocido anteriormente como *Streptococcus lactis*), es un cultivo iniciador en diversos productos fermentados, pero especialmente en productos lácteos, ha sido ampliamente utilizado en diversos

productos como quesos madurados, suero de mantequilla madurado, cremas de leche maduradas y muchos otros (Rodríguez *et al.*, 2005). Una característica importante de este microorganismo es que, puede ser utilizado como bioconservador, controlando el crecimiento de bacterias patógenas como el *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157;H7 e incluso algunas especies del género *Clostridium*, los cuales son responsables de serios problemas de conservación en diversos productos lácteos (Rodríguez *et al.*, 2005).

1.3 Probióticos

La definición actualmente por la FAO (Food and Agricultural Organization) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), de las bacterias probióticas es que son "microorganismos vivos que al ser ingeridos en cantidades adecuadas ejercen una influencia positiva en la salud o en la fisiología del hospedero". La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos, una vez que son ingeridos ocurren cambios en la microflora intestinal que repercuten positivamente en el estado de salud del consumidor. Es importante resaltar que la flora intestinal es una comunidad interactiva de organismos con funciones específicas para mantener el estado de salud. Entre las bacterias probióticas más utilizadas se incluyen a los siguientes microorganismos: *Lactobacillus acidophilus*, *L. plantarum*, *L. casei*, *L. casei spp rhamnosus*, *L. delbrueckii spp bulgaricus*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *Lactococcus lactis spp. lactis*, *Lactococcus lactis ssp. cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, entre otros (González *et al.*, 2003). Para que una de estas bacterias sea considerada probiótica, se deben cumplir con ciertos criterios de evaluación, los cuales son innatos para estos microorganismos, Tripathi y Giri, (2014) mencionan que los principales criterios son:

- **Seguridad:** su consumo no debe perjudicar de ninguna forma al consumidor, en el caso de las BAL, estas son generalmente reconocidas como seguras

(GRAS, por sus siglas en inglés). Sin embargo, esto no garantiza que todas las bacterias de este grupo sean probióticas.

- **Viabilidad:** la viabilidad es la capacidad que tienen estos microorganismos de permanecer vivos, tanto en el alimento como en el intestino del consumidor, y durante un tiempo determinado con el fin de lograr los beneficios de dichos alimentos. Además, estos microorganismos deben resistir las concentraciones de ácidos y sales biliares del estómago o intestino delgado de los seres humanos y animales. Para comprobar la resistencia a estos medios adversos existe una prueba que se realiza *in vitro* a pH de 2 y con sales biliares.
- **Resistencia a los antibióticos:** esta cualidad es necesaria para que las bacterias probióticas tengan la posibilidad de colonizar el intestino cuando se han sufrido daños por el consumo de medicamentos.
- **Antagonismo contra bacterias patógenas:** es decir, deben ser capaces de competir por sitios de adhesión en el epitelio o incluso inhibir la proliferación de bacterias patógenas para que éstas no dañen al huésped

Finalmente, entre los principales beneficios otorgados por los probióticos hacia el hospedero destacan supresión de la colonización de patógenos, control de infecciones en el intestino y el tracto urogenital, control del colesterol sérico, así como de enfermedades cardíacas, estimulación del sistema inmune y del movimiento intestinal, la mejora de la digestión de la lactosa, el aumento de la biodisponibilidad de los minerales, la síntesis de vitaminas y la actividad anticancerígena, y la prevención frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas (González *et al.*, 2003).

1.4 Bacterias patógenas presentes en alimentos

Los microorganismos patógenos son aquellos que, al ingresar a un hospedero, son capaces de provocar una enfermedad o infección en ellos. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son enfermedades que se adquieren por el consumo de alimentos contaminados. Las causas más comunes son intoxicaciones

e infecciones, se estima que en el mundo unos 600 millones de personas se enferman al año por consumir alimentos contaminados por bacterias (OMS, 2015). Algunas bacterias patógenas empleadas en esta investigación se describen a continuación:

1.4.1 *Salmonella Thyphimurium*

Es una bacteria del tipo bacilo, Gram negativa, flagelada, cuyo nombre completo es *Samonella enterica* subespecie *entérica* serovariedad *Thyphimurium*. Es un organismo unicelular flagelado anaerobio facultativo, causante de la enfermedad conocida como salmonelosis, enfermedad que ataca tanto a humanos como a otras especies animales. El epíteto Typhimurium significa tifus del ratón. Esta bacteria causa en los ratones una enfermedad similar al tifus. La salmonelosis se produce debido a la acción de la bacteria que se aloja en el intestino delgado. Allí invade el epitelio del intestino y segrega una enterotoxina que penetra las células del mismo, esta enterotoxina es un 98 % similar a la enterotoxina de *Vibrio cholerae*. La secuencia de eventos que determinan la patogénesis de *Salmonella* Typhimurium incluye la adherencia a la superficie de la célula epitelial. Posteriormente la invasión de la bacteria al interior de la célula hospedera. Una vez dentro provoca desequilibrios metabólicos que causan la activación de la enzima adenilatociclasa, destrucción de vellosidades, secreción de citosinas proinflamatorias, disminución de la capacidad de absorción intestinal, entre otros efectos (Figueroa y Verdugo, 2005).

1.4.2 *Staphylococcus aureus*

Es la especie del género *Staphylococcus* más patógena, siendo la causa principal del 60 % de las infecciones purulentas agudas en el mundo, debido a que es un germen piógeno por excelencia. Este microorganismo está ampliamente distribuido en la naturaleza, se le puede encontrar en el ambiente y como microbiota habitual de piel y mucosas de la boca, intestino y nariz en los seres humanos y los animales.

Es por ello que el aislamiento de *S. aureus* será clínicamente importante si existe un proceso infeccioso evidente, ya que es un colonizador habitual de la piel. Cuando *S. aureus* vence las barreras naturales de defensa e ingresa al organismo, puede causar patologías que van desde lesiones localizadas, infecciones sistémicas hasta intoxicaciones a distancia. Algunas personas son catalogadas como portadoras asintomáticas de *S. aureus* cuando albergan cepas patógenas en las fosas nasales y en las manos. El porcentaje de portadores oscila entre 20 – 40%, siendo responsables de su diseminación.

La intoxicación alimentaria producida por *S. aureus* se presenta al ingerir alimentos contaminados con sus enterotoxinas en el alimento, generalmente está presente en alimentos ricos en carbohidratos. Produce diarrea y vómitos sin fiebre 5 h después de consumir el alimento. La recuperación es espontánea (Ryan, 2010).

1.5 Quesos artesanales

Los quesos artesanales se producen principalmente a partir de leche cruda, de acuerdo con su contenido de humedad se clasifican en: suave, semiduro y duro, en términos de maduración, la mayoría no son madurados y pocos pueden estar semi-madurados o madurados. Dentro de las variedades representativas de quesos artesanales producidos en México se encuentran los siguientes: queso crema y bola de Ocosingo (Chiapas); queso guaje, cincho, hoja rueda y poro de balancan (Tabasco); queso Oaxaca (Oaxaca); adobera, queso cotija y queso de morral (Jalisco), entre otros. Algunas investigaciones reportan que los quesos artesanales pueden considerarse inseguros para el consumo humano, ya que se han asociado con diferentes enfermedades alimenticias, sin embargo, la mayor dificultad en torno a los quesos artesanales es la escasez de información, ya que sólo algunos de estos quesos se han caracterizado sistemáticamente (González-Córdova *et al.*, 2016).

1.5.1 Queso adobera

El queso adobera es elaborado de forma artesanal en el estado de Jalisco y en algunas regiones de Guanajuato, Michoacán, Querétaro e Hidalgo, es un queso

fresco (de acuerdo con su contenido de humedad) (NOM-243-SSA1-2010); es rectangular, de color blanco a ligeramente amarillento, textura medianamente firme y de pasta granulada. En la mayoría de las ocasiones presenta una corteza fina asociada a un ligero añejamiento (el cual generalmente se realiza en un rango de 3 a 5 días). Se fabrica, con leche cruda de vaca de raza Holstein, por lo que la microflora nativa es la responsable de la acidificación del mismo (Cervantes *et al.*, 2008).

Uno de los principales problemas que enfrenta el queso adobera, es que, se elabora con leche cruda sin pasteurizar, proveniente de sistemas de lechería familiar, donde, debido a la fuerte manipulación que sufre y a prácticas inadecuadas de higiene durante el ordeño, puede presentar altos conteos en bacterias; lo que podría comprometer la calidad sanitaria e inocuidad del queso que se elabore (Ruvalcaba *et al.*, 2011), sin embargo, también contiene bacterias que son las que otorgan las características sensoriales de estos productos, dentro de estas bacterias encontramos a bacterias ácido lácticas como *Lactococcus lactis* (González-Córdova *et al.*, 2016).

1.6 Modelos de simulación gastrointestinal

El tracto gastrointestinal (TGI) está integrado por las siguientes partes: boca, faringe, esófago, estómago, intestinos delgado y grueso, recto y ano, las cuales se presentan en la figura 3. El intestino delgado está compuesto por el duodeno, yeyuno e íleon y el intestino grueso está formado por el colon ascendente, colon transversal y colon descendente (Prakash *et al.*, 2011).

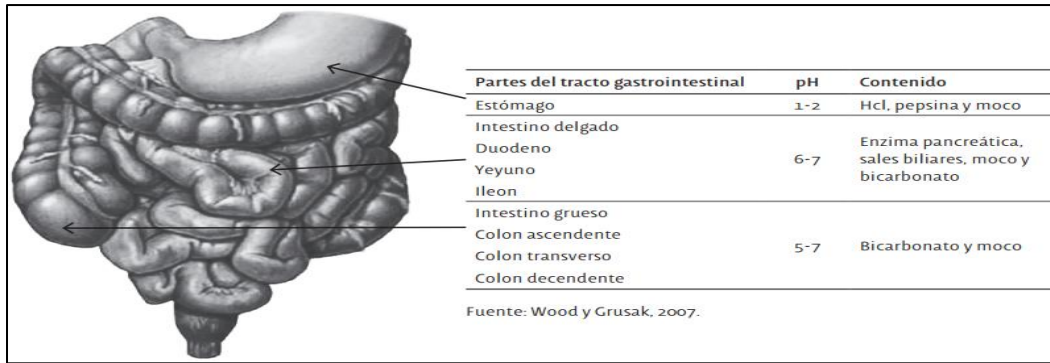


Figura 3. Partes del tracto gastrointestinal. Tomado de: Prakash et al., 2011.

Por otro lado, es importante mencionar la composición principal de las secreciones gástrica del TGI.

- ✓ Secreción gástrica: está constituida principalmente de HCl, pepsina (la cual se activa a un pH óptimo de 3) y electrolitos como K^+ , Na^+ , Mg^{++} , fosfato y sulfato.
- ✓ Secreción intestinal: está integrada por HCO_3^- y K^+ .
- ✓ Secreción biliar: está constituida por Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^- y bilis (la cual está integrada por ácidos biliares, fosfolípidos y colesterol).
- ✓ Secreción pancreática: está compuesta mayoritariamente por Na^+ y HCO_3^- , aunque también en una cantidad mínima por K^+ y Cl^- , además de enzimas como tripsina, quimiotripsina, carboxipeptidasas, proelastasas y lipasas (Mataix-Verdú, 2009).

1.6.1 Clasificación de los modelos gastrointestinales

Para poder valorar la viabilidad y resistencia de los probióticos se han propuesto modelos gastrointestinales que simulan las condiciones del TGI, los cuales se clasifican en modelo convencional y modelos dinámicos (continuos) (Mataix-Verdú, 2009; Prakash *et al.*, 2011).

Modelo convencional: se le denomina convencional debido a que la gran mayoría de las investigaciones de resistencia de probióticos encapsulados lo utilizan. Simula

las condiciones de la digestión del estómago o intestino, consiste de un sólo reactor o recipiente de vidrio con agitación y temperatura constante (37°C), dividiéndola en tres fases, las cuales son:

- ✓ Fase gástrica: el medio que más se utiliza es NaCl, para tener un medio isotónico y mantener la integridad y viabilidad de los microorganismos. Mantener un pH del fluido gástrico de 1 a 3 (intervalo de pH en el estómago de los seres humanos), para el ajuste del pH se utiliza HCl 0.1 M. Con frecuencia, a este fluido se le adiciona pepsina y ocasionalmente lipasa. Por último, el tiempo de exposición de los probióticos en este medio es de hasta 120 min (Nejati *et al.*, 2011).
- ✓ Fase entérica: el medio más utilizado contiene sales de sodio como Na₂HPO₄. El rango de pH utilizado para este fluido es de 6 a 8, aunque algunos autores sugieren utilizar bilis y enzimas pancreáticas, el tiempo de exposición utilizado para esta fase es de 120 min (Fritzen-Freire *et al.*, 2013).
- ✓ Fase entérica final: utiliza las mismas condiciones de la fase entérica pero ajustando el pH de 6.7 a 7.5 con un tiempo de exposición de 120 min (Nejati *et al.*, 2011).

Existen dos modelos dinámicos, los cuales son simuladores del TGI humano y consisten de un reactor para cada parte del tubo digestivo (estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente) donde la temperatura (37°C) es controlada al igual que el pH (Afkhami *et al.*, 2007).

- ✓ Primer modelo consiste en tomar una alícuota de la fase gástrica y esta se adiciona a la fase entérica o se modifica el pH del vaso que contiene el fluido gástrico.
- ✓ Segundo modelo los reactores se mantienen con agitación y temperatura constante, el flujo se genera a través de una bomba peristáltica (semiautomatizada), ejemplo de este modelo es el simulador del ecosistema microbiano del intestino humano denominado SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem), desarrollado por Molly, Van de Woestyne y Verstraete (1993) para estudiar la interacción de la microbiota intestinal con el colon.

2. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias ácido lácticas (BAL) presentan múltiples beneficios en el desarrollo de alimentos, principalmente en los denominados alimentos funcionales donde participan como microorganismos probióticos, característica que genera beneficios al hospedero, entre los principales beneficios se pueden mencionar: mejora en el tránsito intestinal, control de infecciones en intestino y tracto urogenital, control del colesterol sérico y adherencia al epitelio intestinal, lo que significa que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos patógenos, esta característica ha despertado el interés de utilizar a las BAL o a sus metabolitos como posibles antimicrobianos. Una BAL ampliamente utilizada en alimentos es *Lactococcus lactis* la cual contribuye otorgando características sensoriales en productos lácteos, sin embargo, es necesario realizar pruebas que avalen las características como probióticos o como agentes antimicrobianos para determinar sus aplicaciones potenciales. Por lo cual, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad probiótica y antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de queso adobera.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar la actividad probiótica y antimicrobiana de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de un queso adobera artesanal.

3.2. Objetivos específicos

- Evaluar la actividad probiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* en diferentes solutos, valores de pH y en un proceso de simulación gastrointestinal.
- Determinar la actividad antimicrobiana de sobrenadantes producidos por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* contra microorganismos patógenos importantes en alimentos.
- Identificar el perfil electroforético del sobrenadante obtenido *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

- Material de vidrio: el necesario para cada determinación.
- Material biológico: microorganismos obtenidos de la colección de cepas del laboratorio de Bioquímica-Alimentos de la Facultad de Ciencias Químicas, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*).
- Reactivos: grado analítico, los necesarios para cada determinación.

La Tabla 1 y 2 presentan los equipos y métodos utilizados en la realización del proyecto.

Tabla 1. Equipos utilizados en la investigación.

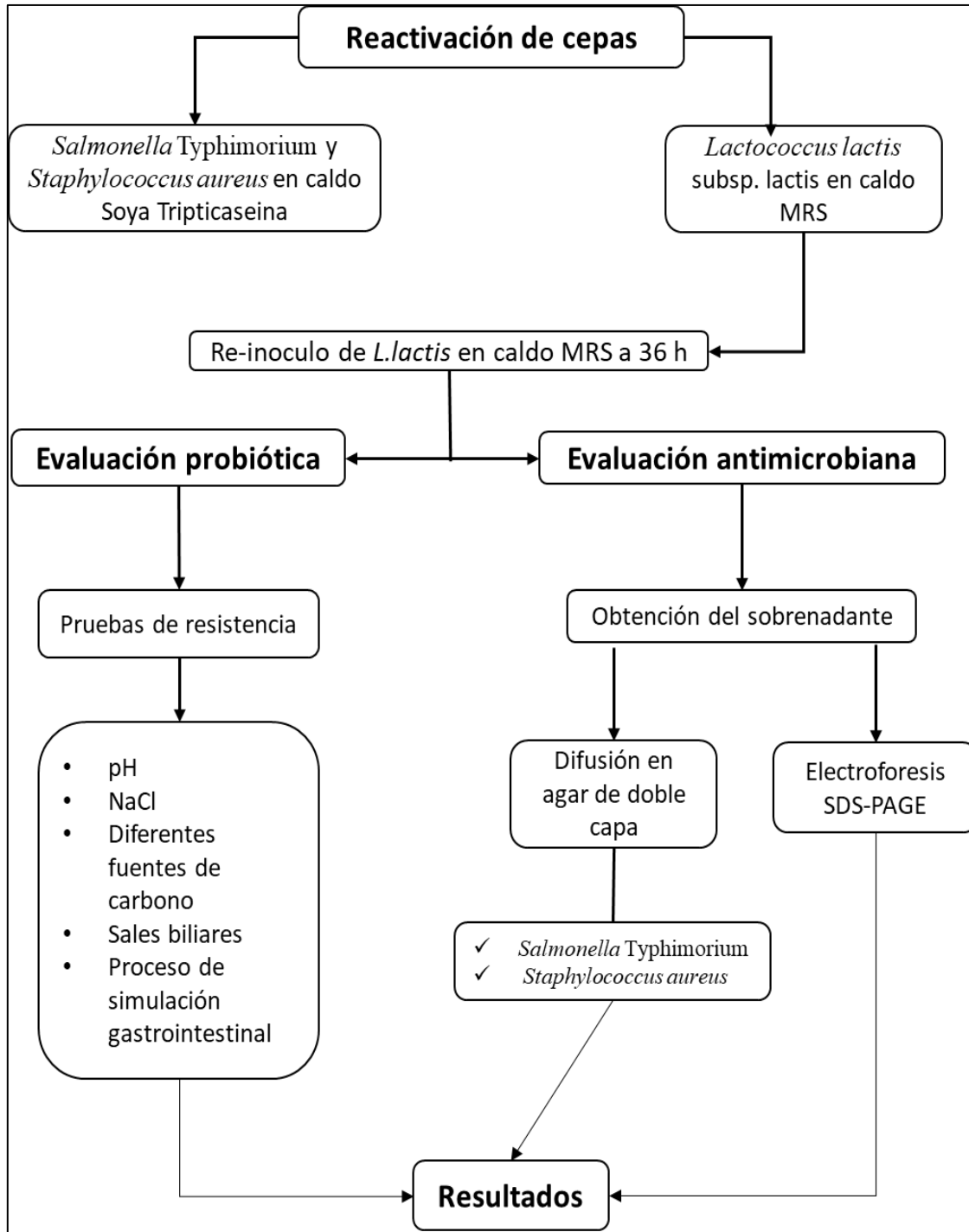
Equipo	Marca	Modelo
Campana de flujo laminar vertical	Prendo	CFLV-102
Estufa de cultivo	Equipos de laboratorio BG	E-41
Balanza analítica	Ohaus, serie Pioneer	PA 224C
Medidor de pH portátil	Conductronic	1036
Refractómetro digital	Hanna	H196801
Vortex	IKA	Genius 3
Parrilla digital	Fusher Scientific	Isotemp
Autoclave	CISA	AS-25
Incubadora orbital	Prendo	INO-650
Centrifuga	Premiere	XC-2450
Cámara de electroforesis vertical	PROTEAN	CS-SCZ4

Tabla 2. Métodos utilizados en la investigación.

Determinación	Técnica	Referencia
Crecimiento de microorganismos	Método de vertido en placa	NOM-092-SSA1-1994
Simulación gástrica	Modelo convencional de dos fases	Saura-Calixto <i>et al.</i> , 2000
Actividad antimicrobiana	Difusión en agar en doble capa	Muñoz <i>et al.</i> , 2005
Identificación de proteínas	Electroforesis	Sánchez <i>et al.</i> , 2003.

4. DIAGRAMA DE TRABAJO

Diagrama general de trabajo para evaluar el potencial antimicrobiano y probiótico de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*



5. METODOLOGÍA

5.1. Reactivación y conservación microorganismos

Se trabajó con una cepa aislada de queso adobera producido en Lagos de Moreno, Jalisco, la cepa fue identificada como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Albores, 2017). Por otro lado, se utilizaron las bacterias patógenas *Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus* de una colección de microorganismos del laboratorio de Bioquímica-Alimentos de la facultad de ciencias químicas.

Se realizó la reactivación de cada microorganismo en medios específicos, para *L. lactis* se utilizó caldo MRS (De Man, Rogosa y Sharrpe), para las cepas patógenas (*Salmonella* Typhimurium y *Staphylococcus aureus*) se utilizó caldo de Soya Trypticaseína, los medios de cultivo fueron preparados de acuerdo a las indicaciones del proveedor en agua destilada y posteriormente esterilizados en una autoclave a 121°C durante 15 min, al término de la esterilización cada medio de cultivo fue inoculado con el 1% de las cepas, posteriormente se incubaron los medios en una estufa de cultivo a 37°C durante 24 h, una vez generado el crecimiento cada una de las cepas fue colocada en tubos eppendor con glicerol al 20% y mantenidas en refrigeraron (4°C) para su conservación.

5.2. Análisis del potencial probiótico

Se generó el crecimiento de *Lactococcus lactis* en caldo MRS, se incubó a 37°C durante 36 h al término de la incubación se verificó la población del microorganismo, se realizaron las alícuotas necesarias en agua peptonada y utilizando la técnica de siembra (vertido en placa), se colocó en cajas Petri 1 mL de la dilución correspondiente y posteriormente se adicionó agar MRS estéril, las cajas fueron incubadas en anaerobiosis a 37°C durante 48 h, finalmente se realizó en conteo del microorganismos. Con el medio de cultivo restante el microorganismo fue sometido a diferentes pruebas.

5.2.1. Efecto del pH

Se preparó caldo MRS, el cual se ajustó a diferentes valores de pH (2, 3 y 4) con HCl (1N), el caldo se distribuyó en frascos de dilución y se esterilizó, posteriormente cada medio fue inoculado con el cultivo descrito en el apartado 6.2, los medios fueron incubados a 37° C tomándose alícuotas cada hora durante 3 h. Se evaluó el efecto del pH en la población mediante la siembra en cajas Petri con agar MRS, se siguió el procedimiento descrito en el apartado 6.2.

5.2.2. Efecto del cloruro de sodio

Se preparó caldo MRS, el cual fue adicionado con NaCl al 1, 2 y 3%, el caldo se distribuyó en frascos de dilución y se esterilizó, posteriormente cada medio fue inoculado con el cultivo descrito en el apartado 6.2, para el muestreo y evaluación de la población se realizó el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1, solo que el muestreo se realizó al tiempo 0 y después de 24 h.

5.2.3. Efecto de los azúcares

Se evaluó el comportamiento de *L. lactis* subsp. *lactis* en diferentes fuentes de carbono. Se formuló caldo MRS y se sustituyó la dextrosa del medio por diferentes carbohidratos: xilosa, maltosa, lactosa y sacarosa, el caldo se distribuyó en frascos de dilución y se esterilizó, posteriormente cada medio fue inoculado con el cultivo descrito en el apartado 6.2, la población se evaluó al inicio de la inoculación (tiempo 0) y después de 24 h, se realizó el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1.

5.2.4. Efecto de sales biliares

Se preparó caldo MRS, el cual fue adicionado con sales biliares 0.5, 1 y 1.5 %, el caldo se distribuyó en frascos de dilución y se esterilizó, posteriormente cada medio fue inoculado con el cultivo descrito en el apartado 6.2, para el muestreo y evaluación de la población se realizó el procedimiento descrito en el apartado 6.2.1.

5.2.5. Efecto de la simulación gastrointestinal

Se elaboró un sistema gastrointestinal continuo, se preparó un fluido gástrico (FG) y un fluido intestinal (FI). El FG se preparó con agua destilada estéril ajustando el pH a 2 con HCl (1 N), se agregó NaCl y la enzima pepsina, una vez que las sales se solubilizaron la solución se aforó y se filtró en un recipiente estéril con un filtro de 0.45 μm , se colocaron 9 mL de la solución de FG en un tubo estéril y se inoculó con el cultivo descrito en el apartado 6.2, se incubó a 37 °C, con agitación de 110 rpm durante 2 h. Para la simulación intestinal se preparó un FI con agua destilada estéril, ajustando el pH a 7 con NaOH (1 N), se adicionó K_2HPO_4 y pancreatina de porcino, una vez que las sales se solubilizaron la solución se aforó y se filtró en un recipiente estéril con un filtro de 0.45 μm , se colocaron 9 mL de la solución de FI en un tubo estéril y se inoculó con 1 mL del FG después de 2 h, se incubó a 37 °C con agitación de 110 rpm durante 3 h, finalmente se determinó la población después de 5 h siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.2.

5.3. Análisis del potencial antimicrobiano

5.3.1. Obtención de sobrenadantes de *Lactococcus lactis* subsp *lactis*

Después de reactivar la cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como se describió en el apartado 6.1.2, el microorganismo fue adicionado en dos medios MRS formulados, esto se realizó con la finalidad de incrementar la actividad antimicrobiana de la cepa en estudio. Uno de los sistemas contenía caldo MRS más extracto de levadura al 1%, mientras que al segundo contenía caldo MRS modificando el pH a 4.5 con HCl (1N). Los medios se esterilizaron, inocularon e incubaron a 37°C durante 36 h, posteriormente para obtener el sobrenadante, los medios se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min, se separó el sobrenadante de la biomasa utilizando un filtro de 0.45 μm , el cual fue transferido a un recipiente estéril. Finalmente, se eliminó la mayor cantidad de agua de cada sobrenadante

utilizando un rotavapor a 60°C durante 30 min. Los sobrenadantes fueron conservados en refrigeración (4°C) hasta su uso.

5.3.2. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes

Para evaluar la actividad antimicrobiana de cada sobrenadante se utilizó el método de difusión en agar de doble capa, se utilizaron las bacterias patógenas (*Salmonella Typhimurium* y *Staphylococcus aureus*). Se prepararon cajas Petri con agar infusión cerebro corazón (BHI) fosfatado (tabla 3) y se dejaron solidificar, posteriormente se adicionó una segunda capa de agar BHI fosfatado suave (tabla 3), el cual fue previamente inoculado con 30 µL de cada cepa patógena a una concentración de 10^{-2} y 10^{-3} UFC/mL, el agar se dejó solidificar y se realizaron pozos de aproximadamente 0.9 mm de diámetro en los cuales se colocaron 100 µL de los sobrenadantes, las placas fueron colocadas en una campana de flujo laminar hasta la solidificación del sobrenadante. Finalmente, las cajas se incubaron a 37° C durante 18 h, terminado el tiempo se registraron los diámetros de los halos de inhibición (cm), cada prueba se realizó por duplicado.

Tabla 3. Formulación de agar infusión cerebro corazón (BHI).

Reactivos	Agar BHI fosfatado (g/L)	Agar BHI fosfatado suave (g/L)
Fosfato monobásico de sodio	4.3	4
Fosfato dibásico de sodio	10	10
Agar bacteriológico	17	8
Medio BHI	37	15
Agua destilada (mL)	1000	1000

5.4. Electroforesis de proteínas

Para determinar la posible naturaleza proteica del sobrenadante se realizó una electroforesis SDS-PAGE. Se prepararon geles de acrilamida, el gel separador se

preparó con acrilamida al 20 %, mientras que el gel concentrador se preparó con acrilamida al 5%. La muestra (sobrenadante) se mezcló con una solución reguladora (regulador de Laemmil) que por su composición reduce y desnaturaliza las proteínas presentes en la muestra a evaluar. La muestra se sometió a ebullición durante 5 min y empleando una jeringa se colocaron alícuotas de 25 μ L en cada pozo del gel, mientras que, para el marcador molecular (10- 250 kDa) se utilizaron 10 μ L. La separación de corrimiento se llevó a cabo con una fuente de poder aplicando 120 V durante 90 min, posteriormente se realizó el teñido del gel, colocándolo éste en una solución de ácido tricloroacético (12.5 %), se realizaron lavados con agua destilada cada 15 min durante 60 min. El gel fue colocado en una solución de azul de comassie, donde permaneció 12 h y así poder visualizar las bandas, para desteñir el gel se utilizó un kit de 4 soluciones stock. Finalmente, para el secado del gel, éste fue colocado en un marco de plástico en medio de papel celofán dulce, dejándolo durante 72 h, donde se observaron las bandas obtenidas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Análisis del potencial probiótico

6.1.1. Efecto del pH

La evaluación a diferentes valores de pH busca simular el tránsito de la cepa por el tracto gastrointestinal, los diferentes segmentos del tracto digestivo son afectados por variación en el pH del medio. Así, en el estómago se observan pH cercanos a 2, mientras que, en el intestino delgado, existen pH entre 5 a 7 como consecuencia de la secreción de la vesícula (Teijón-Rivera *et al.*, 2006). La figura 5 muestra el comportamiento de la población de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ante diferentes valores de pH durante un período de incubación de 3 h. Al tiempo 0 la población de *L. lactis* fue de 8 a 8.2 ciclos logarítmicos (CL), mientras que después de 3 h, se observa que la población se redujo entre 0.5 y 2 CL, siendo más evidente a valores de pH de 2, esto se debe a que el pH bajo afecta la membrana de fosfolípidos de los microorganismos, lo que produce una disminución de la población. Sin embargo, la capacidad de resistencia a valores superiores a 2, se debe a mecanismos

celulares de cada microorganismo que le permiten mantener el pH interno (Piard *et al.*, 1991). Otro de los factores que argumentan este comportamiento se debe a su capacidad de producir ácidos orgánicos como resultado de la fermentación de carbohidratos (Broadbent *et al.*, 2010). Por lo que, los crecimientos encontrados en esta investigación muestran la viabilidad de *Lactococcus lactis* a valores de pH cercanos a 4, con poblaciones adecuadas para colonizar el tracto digestivo.

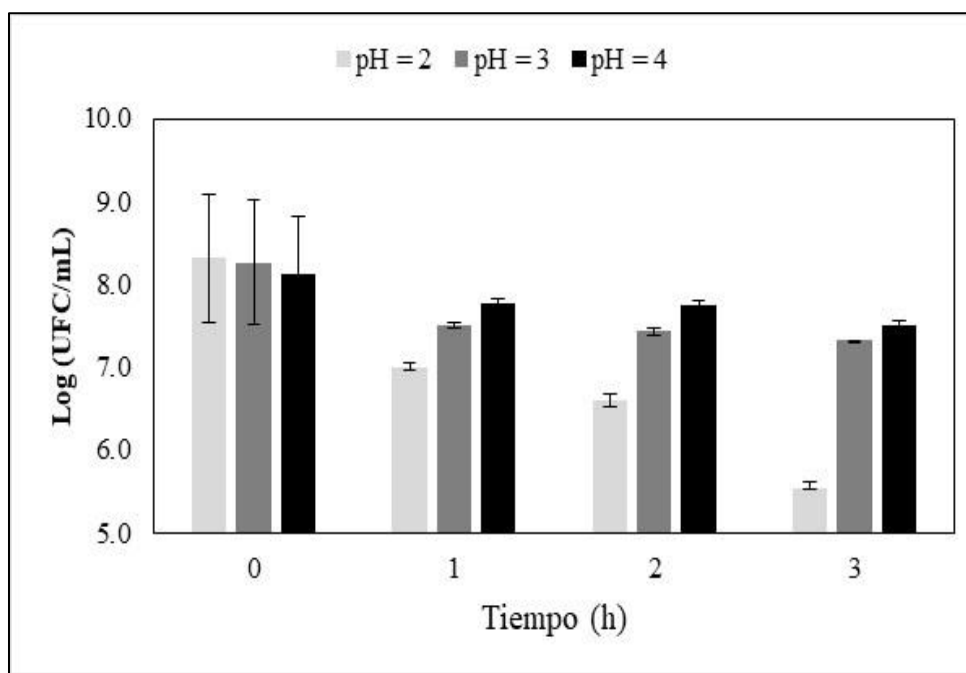


Figura 4. Efecto del pH sobre la población de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* durante un periodo de 3 h.

6.1.2. Efecto de solutos (cloruro de sodio y fuentes de carbono)

Con el objetivo de conocer los perfiles de fermentación por parte de *Lactococcus lactis* se evaluó su crecimiento en diferentes carbohidratos. Los resultados se muestran en la figura 6 A, observándose un aumento de la población después de 24 h en todos los azúcares evaluados, lo que sin duda es una característica relevante a la hora de seleccionar cepas como cultivos iniciadores en productos lácteos (Sánchez-Martínez, 2005). El consumo de azúcares por parte de *L. lactis* demuestra que hace un adecuado uso de estos carbohidratos sin importar el tipo de monosacárido o disacárido presente en el medio de cultivo, lo cual corrobora su

capacidad para producir metabolitos como el ácido láctico (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). La producción de ácido láctico tiene como consecuencia la reducción del pH, sustancia antagónica para bacterias patógenas.

Por otro lado, la prueba de resistencia a NaCl (figura 6 B) muestra que concentraciones altas de NaCl afectan drásticamente el crecimiento de *L. lactis*, sin embargo, concentraciones del 1% son favorables para su desarrollo, aumentando la población 2 CL respecto al tiempo 0. Gallegos *et al.*, (2017) menciona que *L. lactis* puede crecer de manera óptima en presencia de NaCl a concentraciones del 3%, sin embargo, aún la población es baja como para proporcionar beneficios en los alimentos donde se incorpore o se encuentre.

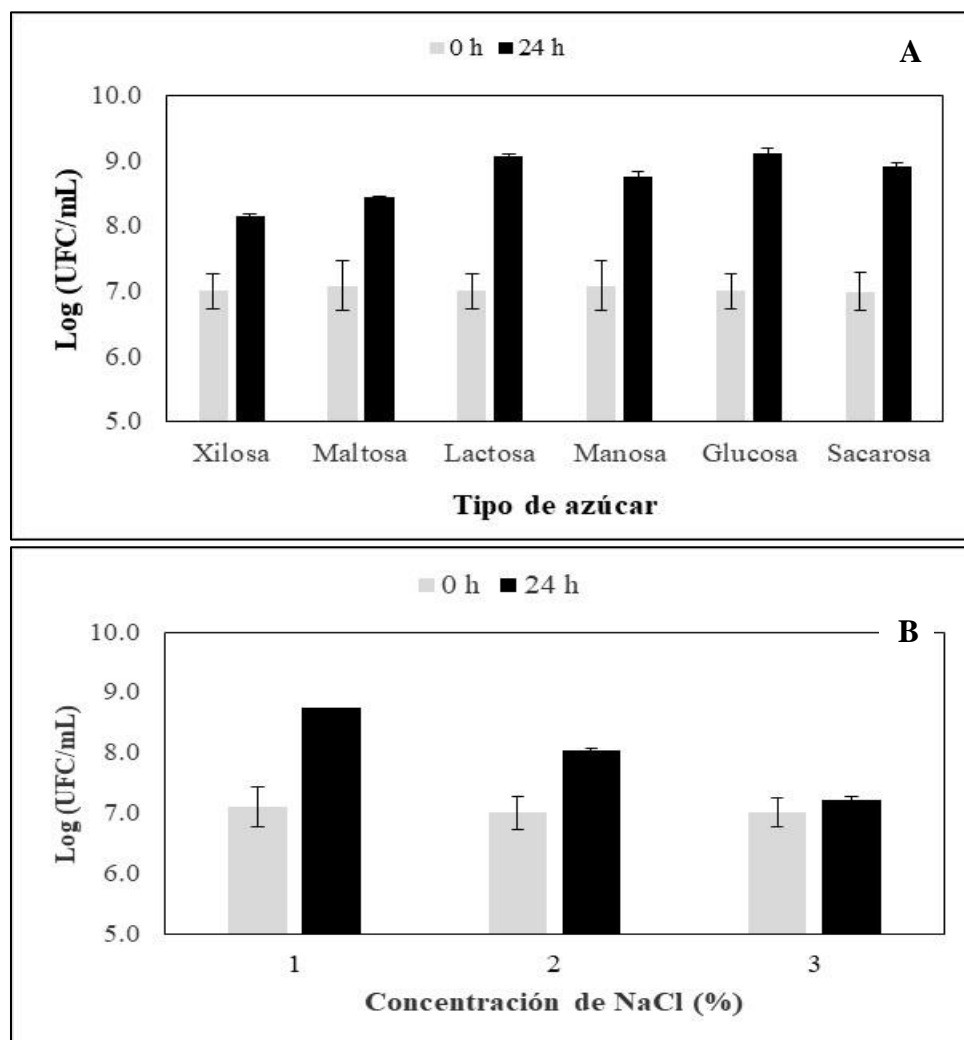


Figura 5. Efecto carbohidratos (A) y concentración de cloruro de sodio (B) sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

6.1.3. Efecto de sales biliares

Las bacterias que tienen la capacidad de resistir las sales biliares tienen más probabilidad de llegar vivas al intestino del huésped. Los resultados de la adición de sales al medio MRS se muestran en la figura 7, mostrando que *Lactococcus lactis* puede resistir concentraciones de 0.5 hasta 1.5 % de sales biliares por un período máximo de 2 h, estos resultados demuestran que *L. lactis* subsp. *lactis* podría ser capaz de sobrevivir a las condiciones fisiológicas *in-vivo* del organismo y llegar al colon en un número suficiente para tener efectos benéficos sobre la salud. Kumar *et al.* (2011) indicaron que las bacterias lácticas presentan tolerancia a las sales biliares, además disminuyen el colesterol en el organismo del huésped. Por otro lado, Hamon *et al.*, (2011) mencionaron que las sales biliares producen estrés en los microorganismos colonizadores del sistema digestivo. Sin embargo, las bacterias generan respuestas fisiológicas como protección celular, generalmente modifican la membrana celular que les permiten tolerar estos cambios y adaptarse al medio gastrointestinal (Wu *et al.*, 2010). En este sentido, como ya se mencionó *L. lactis* mostró una adecuada resistencia a estas condiciones lo que permite atribuirle algunos de los beneficios antes mencionados.

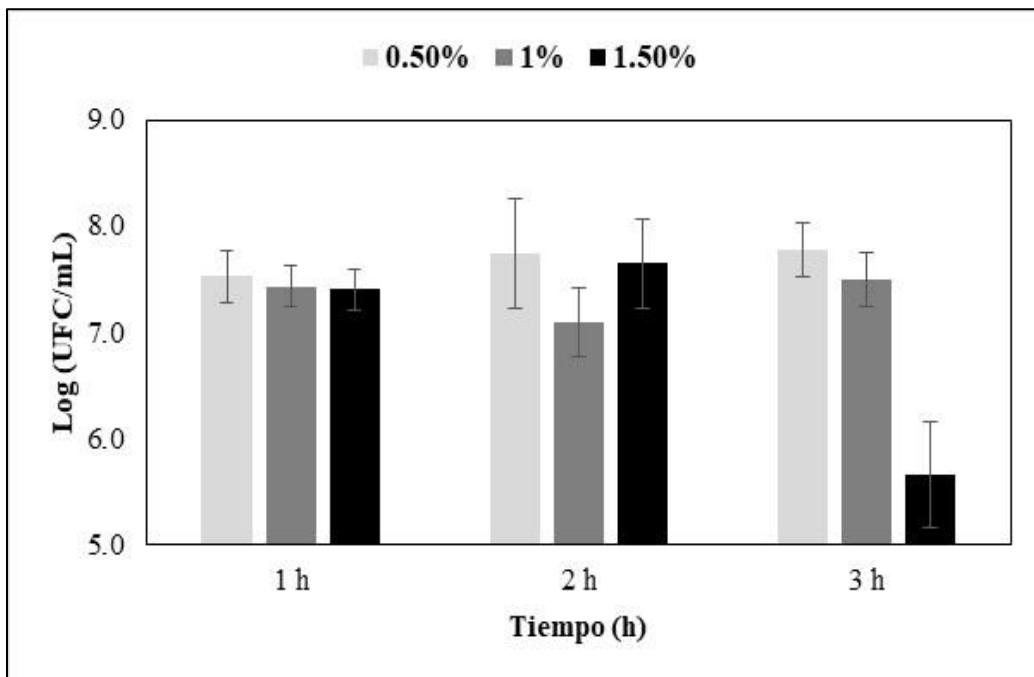


Figura 6. Efecto de adición de sales biliares en el crecimiento de *Lactococcus lactis*.

6.1.4. Efecto de la simulación gastrointestinal

Los resultados mostraron que *Lactococcus lactis* logró sobrevivir en el proceso de simulación continuo obteniendo una población final de 7.13 ± 0.14 Log (UFC/mL) después de 5 h de proceso, disminuyendo únicamente 1 ciclo logarítmico respecto a la población antes del proceso 8.29 ± 0.02 Log UFC/mL. Esto demuestra que *L. lactis* puede ejercer un efecto benéfico en el huésped que consuma quesos como el adobera. Finalmente, *L. lactis* presentó gran resistencia para tolerar rangos pH entre 2 y 7, en este sentido Gallegos *et al.*, (2017) mencionó que *L. lactis* subsp. *lactis* pueden crecer a 40 °C, y pH de hasta 9.2.

6.2. Análisis del potencial antimicrobiano

6.2.1. Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes frente a bacterias patógenas

Lactobacillus lactis es una bacteria que se ha estudiado por presentar un antagonismo a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Rajaram *et al.*, 2010), debido a que una de sus principales características es la producción de nisina (bacteriocina), lo que le permite reducir las poblaciones de bacterianas patógenas presentes en alimentos (Dimov *et al.*, 2005). La tabla 4 muestra el efecto antimicrobiano presentado por los sobrenadantes producidos por *L. lactis* contra *Salmonella Thyphimurium* y *Staphylococcus aureus*, en donde se observa que existió efecto antimicrobiano del sobrenadante cuando se modificó el pH del medio MRS respecto al adicionado con extracto de levadura, además de que hubo una mayor resistencia de *S. aureus* debido a que el halo de inhibición fue de 1.20 cm. En este sentido, se ha reportado que *S. aureus* produce una proteína denominada PBP 2' o 2a que es la responsable de la resistencia a antibióticos y sustancias antimicrobianas (Miranda, 2011).

La inhibición mostrada por el sobrenadante con pH modificado permite determinar que el efecto de la actividad antimicrobiana puede ser causado por la sinergia entre

el pH ácido y la presencia de ácidos orgánicos y/o otros metabolitos que se encuentran en el sobrenadante (Anas *et al.*, 2008). Dicho efecto sinérgico, se considera el principal agente inhibidor del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos (Beshkova y Frengova, 2012). Así mismo, Calderón *et al.*, (2007) reportaron que se presenta una inhibición mayor en las poblaciones de patógenos, al encontrarse en pH ácidos, esta diferencia de comportamiento puede ser debida al efecto de las diversas sustancias producidas por las bacterias ácido lácticas además de las bacteriocinas, ácidos orgánicos (ácido láctico), peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono; así como la producción de otros compuestos antimicrobianos como el diacetilo, el ácido piroglutámico, entre otros. El efecto inhibidor de los ácidos orgánicos se debe principalmente a la forma no disociada de la molécula, que se difunde a través de la membrana celular hacia el citosol más alcalino e interviene con funciones metabólicas esenciales; el efecto tóxico de los ácidos incluye la reducción del pH intracelular y la disipación potencial de la membrana provocando la muerte celular (Šušković *et al.*, 2010).

Tabla 4. Evaluación de actividad de compuestos antimicrobianos (sobrenadante) contra bacterias patógenas.

Bacteria sensible	Tipo de modificación del medio MRS	Población de bacteria sensible (UFC)	Descripción	Tamaño del halo (cm)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	Extracto de levadura (1%)	1x10 ⁻²	No hay efecto	ND
		1x10 ⁻³	No hay efecto	ND
	pH 4.5	1x10 ⁻²	No hay efecto	ND
		1x10 ⁻³	Sí hay efecto	1.43 ± 0.42
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extracto de levadura (1%)	1x10 ⁻²	No hay efecto	ND
		1x10 ⁻³	No hay efecto	ND
	pH 4.5	1x10 ⁻²	No hay efecto	ND
		1x10 ⁻³	Sí hay efecto	1.20 ± 0.14

ND: no determinado

La figura 8 muestra los halos de inhibición del sobrenadante contra *Staphylococcus aureus* (imagen izquierda) y contra *Salmonella* Typhimurium (imagen derecha).

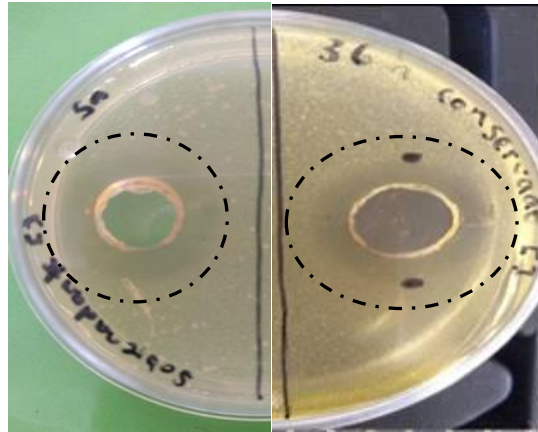


Figura 7. Halo de inhibición contra *Staphylococcus aureus* (izquierda) y contra *Salmonella* Typhimurium (derecha).

Tong *et al.*, (2011) mencionaron que *L. lactis* tiene características dominantes en la competencia contra bacterias Gram +, debido a la producción de la bacteriocina nisina, además indicaron que presenta acción antagónica frente a *Streptococcus mutans*, una de las principales bacterias cariogénicas.

Los resultados encontrados en esta investigación son similares a los reportados por Sadiq *et al.*, (2014) donde se observa actividad antimicrobiana de *L. lactis* frente a *E. coli* y *S. aureus*, al igual que los resultados reportados por Hemaiswarya *et al.*, (2013), esto demuestra la capacidad inhibitoria de la cepa láctica sobre bacterias patógenas y su importancia en la utilización como antimicrobiano.

6.2.2. Electroforesis del sobrenadante

Debido a los resultados de la actividad antimicrobiana, se decidió evaluar únicamente el sobrenadante producido en caldo MRS y ajustado a pH 4.5. La figura 9 muestra la electroforesis del sobrenadante producido por *L. lactis* (carril 2) y en el carril 1 se presenta el marcador de referencia con un peso molecular de 10 kDa. En el carril 2 se presenta una banda difusa y tenue por debajo de los 10 kDa, lo que podría indicar la presencia de un posible péptido debido a la presencia de esta

banda dado que algunos de los pesos moleculares de bacteriocinas producidas por las bacterias lácticas son menores a 10 kDa. Por ejemplo Barefoot y Klaenhammer (1984) reportaron que lactacina B presenta de 6 – 6.5 kDa, pediocina AcH tiene 2 – 7 kDa (Bhunia *et al.*, 1988), lactocina F, de 2 – 5 kDa (Muriana y Klaenhammer, 1991), lactocina 481, presenta de 1 - 7 kDa (Piard *et al.*, 1992) y pediocina SJ-1, tiene 4 kDa (Schved, 1993).

La producción de bacteriocinas estaría asociado como una propiedad importante para un cultivo iniciador como *Lactococcus lactis*, ya que, al establecer una competencia de éste, con la microbiota normal del alimento logro conseguir un mayor control y uniformidad de los procesos de fermentación.

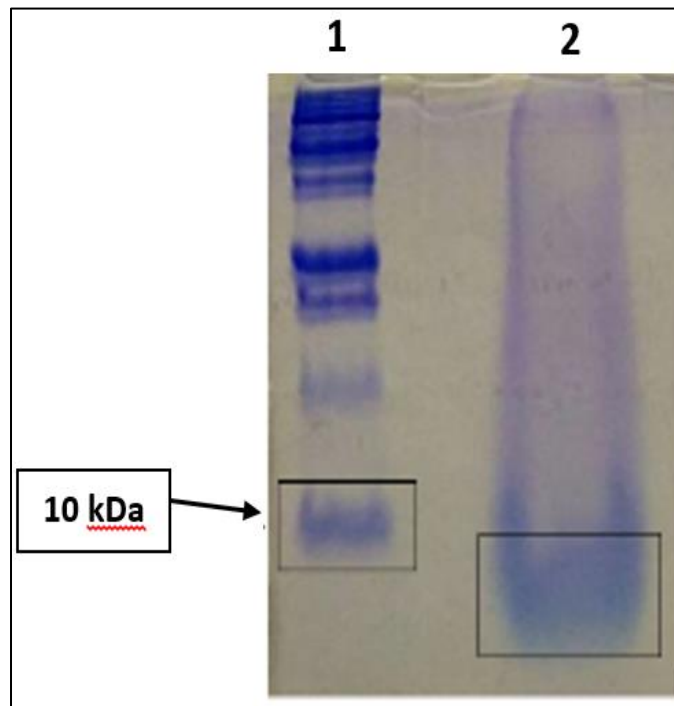


Figura 8. Electroforesis en gel de acrilamida del sobrenadante producido por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*.

8. Conclusiones

- *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislado de queso adobera puede ser considerado como probiótico debido a la resistencia presentada a sales biliares y al proceso de simulación gastrointestinal, además es capaz de producir sustancias de naturaleza proteica que inhiben principalmente a *Salmonella* Typhimorium.
- El sobrenadante producido por *L. lactis* y modificado con pH 4.5, inhibe a los patógenos como *Salmonella* y *Staphylococcus*, lo que indica que el sobrenadante si es una fuente de antimicrobiano al ser usado en alimentos.
- El sobrenadante producido por *L. lactis* presentó un mayor halo de inhibición contra *Salmonella* Typhimurium.
- La electroforesis realizada al sobrenadante indica la presencia de péptidos que podrían estar asociados con el efecto antimicrobiano.

9. Recomendaciones

- Evaluar el efecto antimicrobiano de los sobrenadantes a pH 6.5 para descartar la inhibición por la acción de los ácidos orgánicos.
- Evaluar la actividad antimicrobiana del sobrenadante frente a otras bacterias patógenas como *Lysteria monocytogenes* y *Escherichia coli*.
- Analizar el comportamiento del sobrenadante como antimicrobiano, ante el cambio de pH, tratamiento térmico y enzimas (proteinasas).
- Evaluar la actividad antimicrobiana de diferentes concentraciones del sobrenadante.
- Utilizar un marcador de menor peso molecular para establecer el peso molecular específico del sobrenadante.

7. Bibliografía

- Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Sonomoto, K. (2013). Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 31(6): 877-902.
- Afkhami, F., Ouyang, W., Chen, H., Lawuyi, B., Lim, T., Prakash, S. (2007). Impact of orally administered microencapsules on gastrointestinal microbial flora: *in-vitro* investigation using computer controlled dynamic human gastrointestinal model. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. 35: 359-375.
- Alquicira, L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. México.
- Anas, M., Eddine, H.J., Mebrouk, K. (2008). Antimicrobial activity of *Lactobacillus* species isolated from algerian raw goats' milk against *Staphylococcus aureus*. *World Journal of Dairy and Food Sciences*. 3(2): 39-49.
- Bachmann, H., de Wilt, L., Kleerebezem, M., Van Hylckama Vlieg, J.E. (2010). Time-resolved genetic responses of *Lactococcus lactis* to a dairy environment. *Environment Microbiology*. 12(5):1260-1270.
- Beshkova, D., Frengova, G. (2012). Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry. *Engineering in Life Sciences*. 12(4):1-14.
- Broadbent, J., Larsen, R., Deibel, V., Steele, J. (2010). Physiological and transcriptional response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to acid stress. *Journal of Bacteriology*. 192(9): 2445-2458.
- Cabeza-Herrera, E.A. (2006). Bacterias ácido-lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estárter para la industria láctea y cárnica. Conferencia dada en: Simposio Regional de Microbiología "Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo", Universidad Libre, Barranquilla – Colombia. 15 y 16 de septiembre de 2006.

- Calderón, O., Padilla, C., Chaves, C., Villalobos, L., Arias, M.L. (2007). Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57: 51-55.
- Carr, F.J., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. Critical Reviews in Microbiology. 28(4):281-370.
- Cervantes, F., Villegas, A., Cesin, A. (2008). Los quesos mexicanos genuinos/Genuine Mexican Cheeses: Patrimonio cultural que debe rescatarse. Mundo Prensa México.
- Cesa, C. (2016). Avances en la caracterización de la (las) sustancia (s) inhibitoria (s) producida (s) por *Sphingomonas sp.* DS-204 y su efecto contra cepas de los géneros *Klebsiella*, *Burkholderia* y *Streptococcus*. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- Chen, H., Hoover, D.G. (2003). Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety. 2:82-100.
- Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F., Hernández, P.E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. Food Science Technology International. 7(4):281- 305.
- Cotter, P.D., Hill, C., Roos, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. Nature Reviews Microbiology. 3(10):777-788.
- Dimov, S., Ivanova, P., Harizanova, N. (2005). Genetics of bacteriocins biosynthesis by lactic acid bacteria. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 19 (2):4-10.
- Figueroa, I.M., Verdugo, A. (2005) Mecanismos moleculares de patogenicidad de *Salmonella sp.* Revista Latinoamericana de Microbiología. 47(1): 25-42.
- Fritzen-Freire, C., Prudêncio, E., Pinto, S., Muñoz, I., Amboni, R. (2013). Effect of encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to

simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT - Food Science and Technology*. 50: 39-44.

- Gallegos, J., Arce, C., Jordano, R., Arce, L., Medina, L.M. (2017). Target identification of volatile metabolites to allow the differentiation of lactic acid bacteria by gas chromatography-ion mobility spectrometry. *Food Chemistry*. 220: 362-370.
- González, B., Gómez, M., Jiménez, Z. (2003). Bacteriocinas de Probióticos. *Revista de la Facultad de Salud Pública y Nutrición*. 4:20-25.
- González-Córdova, A.F., Yescas, C., Ortíz-Estrada, A.M., De la Rosa-Alcaraz, M.A., Hernández-Mendoza, A., Vallejo-Cordoba, B. (2016). Invited review: Artisanal Mexican chesses. *Journal of Dairy Science*. 99(5): 3252-3255.
- Hamon, E., Horvatovich, P., Izquierdo, E., Bringel, F., Marchioni, E., Aoudé-Werner, D., Ennahar, S. (2011). Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus plantarum* for the identification of key proteins in bile tolerance. *BMC Microbiology*. 11:60-63.
- Hemaiswarya, S., Raja, R., Ravikumar, R., Carvalho, I. (2013). Mechanism of action of probiotics. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 56(1): 113-119.
- Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59(2):171-200.
- Kumar, R., Grover, S., Kumar-Batish, V. (2011). Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *British Journal of Nutrition*. 105:561-573.
- Maldonado, C. (2016). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martín del Campo, C.I., Gómez, H.E., Alaníz R. (2008). Bacterias ácido lácticas con capacidad antagónica y bacteriocinogénica aislada de quesos frescos. *E-Gnosis*. 6:1-5.

- Mataix-Verdú, J. (2009). Tratado de Nutrición y Alimentación (Vol. 1). Barcelona: OCEANO/Ergonomía.
- Miranda, N.M.G. (2011). Resistencia antimicrobiana del *Staphylococcus aureus* en México. Boletín Médico del Hospital Infantil de México. 68(4): 262-270.
- Monroy, M., Castro, T., Fernández, F., Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. Disponible en:
https://www.researchgate.net/profile/Francisco_Fernandez22/publication/228663316_Revision_bibliografica_Bacteriocinas_producidas_por_bacterias_probioticas/links/546e66c20cf2b5fc17607619.pdf
- Muñoz, J. (2003) Bacteriocinas: una estrategia de competencia Microbiana Propuesta como Alternativa de Antibióticos Dirigidos para el Futuro Humano. Programa de Ecología Molecular y Microbiana Centro de Investigación sobre fijación de nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en:
http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_03/Capitulo03.pdf
- Muñoz, J., Fuentes, L.E., Caballero, J. (2005) Antagonism among *Gluconacetobacter diazotrophicus* strains in culture media and in endophytic association. FEMS Microbiology Ecology. 54: 57-66.
- Nejati, R., Gheisari, H., Hosse, S. (2011). Viability of encapsulated *Bifidobacterium lactis* (BB-12) in symbiotic of cheese and it's survival under un vitro simulated gastrointestinal conditions. International Journal of Probiotics and Prebiotics. 6: 197-203.
- NOM-092-SSA1-1994, BIENES Y SERVICIOS. MÉTODO PARA LA CUENTA DE BACTERIAS AEROBIAS EN PLACA.
- NOM-243-SSA1-2010. Productos y servicios. Leche, fórmula láctea, producto lácteo combinado y derivados lácteos. Disposiciones y especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

- OMS. Organización Mundial de Salud. (2015). Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>. Consultado: 01 Noviembre de 2019.
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saga, S., Cantor, A. (2011). The gut microbiota and human health with an emphasis on the use of microencapsulated bacterial cells. Review. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 1-12.
- Parra, R.A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 8(1):1-5.
- Piard, J., Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait. 71:525-541.
- Rajaram, G., Manivasagan, P., Gunasekaran, U., Ramesh, S., Ashokkumar, S., Thilagavathi, B., Saravanakumar, A. (2010). Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. 4(12):895-902.
- Rodríguez, E., Calzada, J., Arques, J.L., Rodríguez, J.M., Nuñez, M., Medina, M. (2005). Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. International Dairy Journal. 15(1): 51-57.
- Rodríguez, C. (2011). Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ryan, K.J., Ray, C. (2010). Sherris. Microbiología Médica. 6ª edición McGraw-Hill, New York, U.S.A.
- Ruvalcaba, G.J.M., Delgado, M.R.J., Ruiz, E.H., López, G.V., Méndez, R.M.D. (2011). Caracterización de las prácticas de ordeño y calidad higiénico-sanitaria de leche en dos municipios de los Altos de Jalisco. In XII Congreso Internacional Inocuidad de Alimentos. Puerto Vallarta, Jalisco. México: Universidad de Guadalajara. Schved, 1993.

- Sánchez, I., Seseña, S., Palop, L. (2003). Identification of lactic acid bacteria from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants by SDS-PAGE whole cell protein fingerprinting. *International Journal of Food Microbiology*. 82:181-189.
- Sánchez-Martínez, J.I. (2005). Potencial biotecnológico de bacterias lácticas silvestres en productos lácteos fermentados: actividad metabólica y producción de exopolisacáridos. Tesis de Doctorado. Universidad de Oviedo.
- Saura-Calixto, F., García-Alonso, A., Goñi, I., Bravo, L. (2000). *In vitro* determination of the indigestible fraction in foods: an alternative to dietary fiber analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48: 3342-3347.
- Smit, G., Smit, B. A., Engels, W.J.M. (2005). Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. *FEMS Microbiology Reviews*. 29(3): 591–610.
- Song, A.A.L., In L.L.A., Lim S.H.E., Rahim, R.A. (2017). Una revisión sobre *Lactococcus lactis*: de los alimentos a la fábrica. *Microbios hecho de la célula*. 16: 51-55.
- Stoyanova, L.G., Ustyugova, E.A., Netrusov, A.I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 48(3):229-243.
- Šušković, J., Kos, B., Beganović, J., Leboš, A., Habjanič, K., Matošić, S. (2010). Antimicrobial activity - the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. *Food Technology and Biotechnology*. 48(3): 296-307.
- Teijón-Rivera, J.M., Garrido-Pertierra, A., Blanco-Gaitán, D., Villaverde-Gutiérrez, C., Mendoza-Oltras, C., Ramírez-Rodrigo, J. (2006). *Fundamentos de Bioquímica Metabólica*. 2ª. edición. Madrid: Editorial TĒBAR, S.L. 5-8 p.p
- Tripathi, M.K., Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 9: 225-241.

- Tong, Z., Zhou, L., Li, J., Kuang, R., Lin, Y. Ni, L. (2011). An *in vitro* investigation of *Lactococcus lactis* antagonizing cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology. 57(4): 376-382.
- Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. Revista Chilena de Nutrición. 36(1): 64-71.
- Wu, R., Sun, Z., Wu, J., Meng, H., Zhang, H. (2010). Effect of bile salts stress on protein synthesis of *Lactobacillus casei* Zhang revealed by 2 –dimensional gel electrophoresis. Journal of Dairy Science. 93: 3858-3868.