



Posgrado en Biotecnología

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

TESIS
“Propiedades probióticas y análisis proteómico de *Pediococcus pentosaceus* 1101”

Para obtener el grado de

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M. en Biotec. Monserrat Escobar Sánchez

Directora:

Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesores:

Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

Ciudad de México a 16, de febrero del 2023

“El Doctorado en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Sistema Nacional de Posgrado (SNP, antes Programa Nacional de Posgrados de Calidad o PNCP) del CONACYT, con la referencia 001466”.

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica de Macromoléculas del Departamento de Biotecnología, División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Edith Ponce Alquicira. Agradecemos al CONACYT por la beca de doctorado otorgada No. 780883.

Ciudad de México a 16 de febrero del 2023.

H. Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis:

“Propiedades probióticas y análisis proteómico de *Pediococcus pentosaceus* 1101”

que presentó:

M. en Biotec. Monserrat Escobar Sánchez

Comité Tutorial:

Directora: Dra. Edith Ponce Alquicira

Asesora: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Asesor: Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

H. Jurado designado

Presidente: Dra. María de Lourdes Pérez Chabela

Secretario: Dr. Ulises Carrasco Navarro

Vocal: Dra. Maricarmen Quirasco Baruch

Vocal: Dr. Luis Fernando Lozano Aguirre Beltrán

AGRADECIMIENTOS

En el desarrollo de mi tesis, elaborada entre 2018 y 2022 para obtener el grado de Doctora en Biotecnología muchas personas intervinieron para que ello fuera posible.

Primeramente, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Edith Ponce Alquicira, por brindarme su apoyo en esta etapa de mi formación académica, por su confianza al permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por su paciencia, consejos y conocimientos transmitidos. Es un gusto trabajar con usted.

A mis asesores, la Dra. María de Lourdes Pérez Chabela y el Dr. Luis Fernando Lozano por guiarme en esta investigación, por sus sugerencias metodológicas y sobre todo por el tiempo que me brindaron para dar sus asesorías, aportar materiales de trabajo, sugerencias y por la revisión del borrador y versión final de tesis.

Les agradezco a la Dra. Carmen Juárez y al Dr. Ulises Carrasco, por asesorarme en el uso de equipos y técnicas, por la colaboración en el artículo de investigación, sus comentarios y sugerencias indudablemente enriquecieron el proyecto.

A los revisores de esta tesis, por el tiempo dedicado a la revisión minuciosa de este manuscrito.

A mi compañero de servicio social, futuro I.A. Luis Enrique por su apoyo y tiempo dedicado a proyectos desarrollados en el laboratorio.

A mis compañeros del Laboratorio W-207, por el trabajo en equipo y que durante los seminarios de grupo siempre escucharon atentamente mis avances de investigación e hicieron sugerencias y críticas constructivas que aportaron al trabajo.

Al pueblo de México, que por medio del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), me concedió una beca de manutención para cursar mi doctorado.

CONTENIDO

1	ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
2	ÍNDICE DE TABLAS.....	9
3	ABREVIATURAS.....	10
4	RESUMEN.....	11
5	ABSTRACT.....	12
6	INTRODUCCIÓN.....	13
7	MARCO TEÓRICO	15
7.1	Bacterias ácido lácticas.....	15
7.2	Las BAL como probióticos.....	16
7.2.1	Resistencia a acidez y sales biliares	17
7.2.2	Propiedades de adherencia	18
7.2.3	Resistencia a antibióticos.....	19
7.3	Compuestos antimicrobianos sintetizados por BAL.....	20
7.4	Proteínas de choque térmico.....	22
7.5	Las BAL como cultivos iniciadores en productos cárnicos.....	23
7.6	Estudios de análisis proteómicos y genómicos en BAL	24
7.7	Género <i>Pediococcus</i>	25
8	ANTECEDENTES	26
8.1	Estudios del potencial probiótico de <i>Pediococcus pentosaceus</i> como cultivo iniciador y en carne	26
9	JUSTIFICACIÓN	28
10	HIPÓTESIS	29
11	OBJETIVOS.....	30
11.1	OBJETIVO GENERAL	30
11.2	OBJETIVOS PARTICULARES	30
12	METODOLOGÍA	31
12.1	Propagación de la cepa	31
12.2	Identificación bacteriana	31
12.3	Ensamble del genoma.....	32
12.4	Evaluación de propiedades funcionales y probióticas	33
12.4.1	Actividad antagónica	33
12.4.2	Cinéticas de crecimiento a diferentes valores de pH.....	34
12.4.3	Actividad proteolítica a diferentes valores de pH.....	34

12.4.4	Actividad inhibitoria a diferentes valores de pH.....	35
12.4.5	Supervivencia de <i>P. pentosaceus</i> 1101 tras la exposición a pH bajo y sales biliares	35.....
12.4.6	Resistencia a antibióticos.....	36
12.4.7	Propiedades de adhesión celular	37
12.5	Análisis proteómico de <i>P. pentosaceus</i> 1101 expuesto bajo condiciones de control y gastrointestinales	38
12.5.1	Exposición de la cepa bajo condiciones gastrointestinales	38
12.5.2	Análisis electroforético por SDS-PAGE y actividad lítica por zimograma	39
12.5.3	Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	40
12.6	Análisis estadístico.....	42
13	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
13.1	Identificación de la cepa	43
13.2	Ensamble del genoma.....	44
13.3	Evaluación de las propiedades funcionales y probióticas.....	45
13.3.1	Actividad antagónica	45
13.3.2	Crecimiento, actividad proteolítica e inhibitoria a diferentes valores de pH ...	46
13.3.3	Supervivencia de <i>P. pentosaceus</i> 1101 tras la exposición a un pH bajo y a la bilis	49
13.3.4	Resistencia a antibióticos.....	52
13.3.5	Propiedades de adhesión celular	53
13.4	Análisis proteómico de <i>P. pentosaceus</i> 1101 expuesto en condiciones de control y gastrointestinales	55
13.4.1	Análisis de SDS-PAGE y determinaciones de la actividad antimicrobiana por zimografía	55
13.4.2	Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	56
14	CONCLUSIÓN.....	64
15	PERSPECTIVAS	65
16	REFERENCIAS	65
17	ANEXOS	73
17.1	Selección de cepa con mayor potencial biotecnológico	73
17.1.1	Aislamiento.....	73
17.1.2	Actividad antagónica y proteolítica	74
17.1.3	Parámetros cinéticos a diferente concentración de NaCl y diferente temperatura.....	75

17.1.4	Actividad proteolítica a diferente concentración de NaCl y temperatura	76
17.1.5	Actividad inhibitoria a diferente concentración de NaCl y temperatura	77
17.2	Determinación de la concentración de proteína	79
18	PRODUCTOS OBTENIDOS	79
18.1	Artículo de investigación	79
18.2	Artículo de revisión	79
18.3	Participación en eventos especializados	79

1 ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Presentación esquemática de las principales vías de fermentación de la hexosa en las BAL [Holzapfel y Wood, 2012].....	16
Figura 2.	Árbol de máxima verosimilitud que muestra la relación filogenética de las especies de bacterias lácticas estudiadas como inoculantes utilizando secuencias del gen <i>ARNr 16S</i> . †Homofermentativo; *Heterofermentativo obligado; ‡Heterofermentativo Facultativo [Carvalho <i>et al.</i> , 2021].....	26
Figura 3.	Resumen gráfico.	43
Figura 4. (a):	Gel de electroforesis al 0.8% de agarosa, se muestra la banda que corresponde al material genético de la cepa 1101; (b): gel de agarosa al 1%, se muestra la banda que corresponde al producto de PCR del gen <i>ARNr 16S</i> de la cepa 1101. M, Marcador de pesos moleculares de ADN Ladder.....	44
Figura 5.	Actividad antagonica de la cepa <i>P. pentosaceus</i> 1101: 1, <i>Escherichia coli</i> ; 2, <i>Enterococcus faecalis</i> ; 3, <i>Listeria monocytogenes</i> ; 4, <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium; 5, <i>Staphylococcus aureus</i> y 6, <i>Weissella</i>	46
Figura 6. (a)	Influencia del pH (pH 2 y 3 durante 9 h, pH 4.5-7-0 durante 24 h) en el crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> 1101 (D.O. máx (●), μ (■). (b) Curva de actividad proteolítica. (c) Actividad inhibitoria con <i>Listeria innocua</i> . Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas (p<0.05) según la comparación múltiple de medias de Duncan. .	48
Figura 7.	Recuento en placa para determinar la viabilidad celular de <i>P. pentosaceus</i> 1101, (a): Control, pH 2.0 y 3.0; (b): Control y 0.5% de sales biliares.	50
Figura 8. (a)	SDS-PAGE 12% y (b) zimograma de la fracción soluble de proteínas intracelulares obtenida con los diferentes tratamientos. Marcador de peso molecular M Bio-Rad Dual Xtra; carril 1-tratamiento de control; carril 2-tratamiento de condiciones gastrointestinales.	56
Figura 9. (a)	Diagrama de Venn y (b) gráfico de barras circular: clasificación de la ontología genética para las proteínas expresadas en ambos grupos; los resultados se resumen en tres categorías principales: proceso biológico (PB), componente celular (CC) y función molecular (FM).....	57

Figura 10. Gráfico de volcano: nivel de cambio de las proteínas de tratamiento y de control. Punto rojo: regulado a la baja; punto verde: regulado al alza; punto gris: no significativo. (<i>t</i> -test $p < 0.1$).....	58
Figura 11. BAL aisladas en MRS-verde de bromocresol.....	73
Figura 12. Actividad proteolítica: cepas 9,15,1101, 1115 y 1119.....	74
Figura 13. Influencia del pH, la concentración de NaCl y la temperatura sobre el crecimiento de <i>P. pentosaceus</i> 1101, (D.O. _{max} (●), μ (■). (a): diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y (b): diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la comparación múltiple de medias de Duncan.....	76
Figura 14. Curvas de actividad proteolítica de <i>P. pentosaceus</i> 1101. (a): Diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y temperatura constante de 37°C; (b): diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por comparación múltiple de medias de Duncan.	77
Figura 15. Curvas de actividad inhibitoria con <i>Enterococcus faecalis</i> (■) y <i>Listeria innocua</i> (□) de <i>P. pentosaceus</i> 1101. (a) Diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y temperatura constante de 37°C; (b) diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres diferentes	78

2 ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Actividad antagónica de <i>P. pentosaceus</i> 1101 contra diferentes microorganismos de prueba.....	45
Tabla 2. Evaluación de la tolerancia a la acidez y las sales biliares: tasa de supervivencia tras la exposición a sales biliares, pH 2 y 3 durante 1 h.....	51
Tabla 3. Perfil de Resistencia a los antibióticos.....	53
Tabla 4. Hidrofobicidad bacteriana (%) de bacterias ácido lácticas.....	54
Tabla 5. Capacidad de auto-agregación (%) de bacterias ácido lácticas.....	54
Tabla 6. Capacidad de co-agregación (%) de bacterias ácido lácticas.....	55
Tabla 7. Lista de las 18 principales proteínas implicadas en los procesos de tolerancia a las condiciones gastrointestinales en <i>P. pentosaceus</i> 1101.....	59
Tabla 8. Lista de las 13 principales proteínas reguladas a la baja y las encontradas sólo en el tratamiento de control.....	62
Tabla 9. Actividad antimicrobiana de las 15 cepas aisladas de chorizo tipo español.....	74

3 ABREVIATURAS

BAL	Bacterias ácido lácticas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
TG	Tracto gastrointestinal

4 RESUMEN

Pediococcus pentosaceus 1101 se identificó mediante la secuenciación del gen *ARNr 16S* y MALDI-Biotyper. La cepa se expuso a condiciones similares a las del tracto gastrointestinal (TG) para evaluar sus propiedades probióticas. Ello incluía la cinética de crecimiento, las actividades proteolíticas e inhibitorias dentro de un rango de pH; su supervivencia a pH bajo y en presencia de sales biliares; la actividad antagonista, las propiedades de adhesión celular y la resistencia a los antibióticos. A continuación, se realizó un análisis genómico y proteómico que implicó la identificación de las proteínas obtenidas en condiciones de control y gastrointestinales. La cepa mostró actividad antagonista frente a bacterias Gram negativas y Gram positivas, alta resistencia a la acidez (87% de tasas de supervivencia logarítmica, pH 2) y a las sales biliares (99% de tasas de supervivencia logarítmica, 0.5% p/v) y unión hidrofóbica; así como sensibilidad a la penicilina, la amoxicilina y el cloranfenicol. Por otra parte, *P. pentosaceus* 1101 tiene un genoma de 1.76 Mbp con 1,754 secuencias codificantes, 55 ARNr y 33 ARNt. El análisis proteómico mostró que 120 proteínas estaban implicadas en mecanismos en los que la cepa percibe los efectos de las sales ácidas y biliares. Además, la cepa produce al menos una enzima lítica (*N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa; 32 kDa), que puede estar relacionada con la actividad antimicrobiana. Por tanto, las proteínas identificadas pueden ser un factor clave en la adaptación de *P. pentosaceus* 1101 al TG y estar asociadas a sus propiedades tecnológicas y probióticas. Basándonos en los resultados del presente estudio, *Pediococcus pentosaceus* 1101 podría tener potencial para su uso como probiótico, ya que puede sobrevivir al paso al intestino, o podría utilizarse como cultivo bioprotector en alimentos fermentados debido a su capacidad para competir con microorganismos alterantes y patógenos. Hemos obtenido una serie de resultados que aportan información sobre cómo responden molecularmente los probióticos al estrés durante el tránsito gastrointestinal y que también podrían ser útiles para la selección de cepas que intervienen en el procesado de alimentos.

5 ABSTRACT

Pediococcus pentosaceus 1101 was identified by sequencing of the *16S rRNA* gene and MALDI-Biotyper. The strain was exposed to conditions that resemble the gastrointestinal tract (GT) to evaluate its probiotic properties. That included the growth kinetics, proteolytic and inhibitory activities within a pH range; its survival at low pH and in the presence of bile-salts; the antagonistic activity, cell-adhesion properties, and antibiotic resistance. Followed by a genomic and proteomic analysis that involved the identification of proteins obtained under control and gastrointestinal conditions. The strain showed antagonistic activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, high resistance to acidity (87% logarithmic survival rate, pH 2) and bile salts (99% logarithmic survival rate, 0.5% w/v) and hydrophobic binding; as well as sensitivity to penicillin, amoxicillin, and chloramphenicol. On the other hand, *P. pentosaceus* 1101 has a genome size of 1.76 Mbp with 1,754 coding sequences, 55 rRNAs and 33 tRNAs. The proteomic analysis showed that 120 proteins were involved in mechanisms in which the strain senses the effects of acid and bile salts. Besides, the strain produces at least one lytic enzyme (*N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; 32 kDa), that may be related to the antimicrobial activity. Therefore, proteins identified may be a key factor when it comes to the adaptation of *P. pentosaceus* 1101 into the GT and associated with its technological and probiotic properties. Based on the results of the present study, *Pediococcus pentosaceus* 1101 could have potential for use as a probiotic, as it can survive the passage to the gut, or could be used as a bioprotective culture in fermented foods due its ability to compete with spoilage and pathogenic microorganisms. We obtained a series of results that provide information on how probiotics respond molecularly to stress during gastrointestinal transit and that could also be useful for the selection of strains involved in food processing.

6 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los probióticos se han utilizado en la producción de varios alimentos funcionales, suplementos dietéticos y productos biofarmacéuticos [Fan *et al.*, 2022]. El término probiótico hace referencia a un cultivo de microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas (al menos 10^8 UFC) [Sanders *et al.*, 1993], confieren un beneficio a la salud del huésped, como efectos inmunomoduladores, anticancerígenos, hipolipemiantes, antagonistas de bacterias patógenas, que refuerzan la barrera intestinal y equilibran la microbiota intestinal [Li *et al.*, 2021; Yang *et al.*, 2020]. La mayoría de los probióticos para uso en humanos pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) [Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013], que se emplean habitualmente para producir alimentos fermentados, como lácteos, carnes y verduras. Las cepas probióticas comprenden miembros de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, entre otros, y están reconocidas genéticamente como seguras [Wessels *et al.*, 2004].

Se ha establecido que los aislados microbianos destinados a ser utilizados como probióticos deben cumplir varios criterios, como su capacidad para sobrevivir a través del TG superior, y tolerar los jugos gástricos humanos, así como la bilis humana y la secreción pancreática durante el tránsito a través del intestino. Las bacterias probióticas también deben mostrar adherencia a las superficies epiteliales y cierta resistencia a los antibióticos, para sobrevivir en el TG del huésped y ejercer sus actividades beneficiosas sobre él [Śliżewska *et al.*, 2021]. La colonización del intestino por bacterias probióticas puede impedir el crecimiento de bacterias nocivas mediante la exclusión competitiva, la modulación del sistema inmunitario y la producción de ácidos orgánicos, entre otros compuestos antimicrobianos [Bao *et al.*, 2010]. Las BAL son residentes normales del TG, el número de BAL en el estómago es <3 log UFC/mL, en el íleon 2-5 log UFC/g y en el colon 4-9 log UFC/g [Gorjbach *et al.*, 1967]. Las BAL con propiedades probióticas también pueden utilizarse como cultivos iniciadores en ciertos productos alimentarios, como los productos cárnicos fermentados, contribuyendo así al desarrollo de la textura, el sabor y la vida útil. Las BAL probióticas deben adaptarse al entorno heterogéneo que se encuentra en la carne y otros sistemas alimentarios, también deben ser un fuerte competidor frente a la microbiota natural y crecer en un número que tenga un efecto beneficioso para la salud [Erkkilä y Petäjä, 2000]. La actividad antagonista de las BAL se debe principalmente a la producción de ácidos orgánicos derivados del metabolismo

de la glucosa, pero otros posibles metabolitos incluyen bacteriocinas y pepti-doglicano hidrolasas (PGH) entre otros péptidos antimicrobianos, que también son responsables de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos patógenos y alterantes [Arief *et al.*, 2015; García-Cano *et al.*, 2015]. La respuesta celular a las variaciones ambientales extremas, o respuestas al estrés, se caracteriza por cambios en la expresión génica y la fisiología celular. Estos cambios permiten a los microorganismos adaptarse a nuevas condiciones ambientales [Eichelmann, 2006], donde las proteasas y PGH pueden ser constitutivas o parcialmente inducibles, y su síntesis está fuertemente influenciada por factores como los componentes del medio, el pH y las variaciones de temperatura.

El género *Pediococcus* pertenece al grupo de las BAL, filo Firmicutes, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales* y familia *Lactobacillaceae* [Zheng *et al.*, 2020]. El género *Pediococcus* spp. incluye varias especies, como *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. inopinatus*, *P. dextrinicus*, *P. clauseni*, *P. cellicola*, *P. ethanolidurans*, *P. parvulus* y *P. stilesii*. En concreto, se ha descrito que *P. pentosaceus* forma parte de la microbiota de varios alimentos, como el queso, bebidas, encurtidos, vino, los productos lácteos y la carne [Zommiti *et al.*, 2018]. Se utiliza habitualmente como cultivo iniciador debido a su actividad acidificante y proteolítica, que influye en las características sensoriales de varios productos fermentados, como las carnes fermentadas [Doyle *et al.*, 2006]. Además de su uso potencial como cultivos iniciadores, diferentes cepas pertenecientes al género *Pediococcus* tienen un uso potencial como bacterias probióticas [Hernández-Alcántara *et al.*, 2018], ejerciendo efectos beneficiosos a través de una variedad de mecanismos complementarios, incluyendo resistencia a la acidez, sales biliares y actividad antimicrobiana frente a patógenos [Zommiti *et al.*, 2018]. Los métodos proteómicos basados en espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS/MS) ofrecen ventajas en cuanto a velocidad y fiabilidad en comparación con otros métodos tradicionales como la electroforesis bidimensional, y permiten identificar y caracterizar el proteoma bacteriano global, incluyendo la búsqueda de factores asociados a la patogenicidad así como a la sensibilidad antibiótica [Abril *et al.*, 2022]. Algunos informes relacionados con el análisis proteómico de *P. pentosaceus* han demostrado que esta bacteria es capaz de modular su proteoma cuando se expone a diferentes ambientes estresantes como el calor, el frío, el ácido, la bilis y el estrés oxidativo; además, se han identificado algunas proteínas que podrían utilizarse como marcadores para evaluar la tolerancia al estrés, lo que

podría ayudar a comprender los mecanismos de tolerancia al estrés, proporcionando así nuevas perspectivas para la producción de probióticos mejorados [Baig *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021]. La cepa de *P. pentosaceus* 1101 fue identificada y seleccionada para su evaluación debido a su amplio espectro de inhibición contra microorganismos patógenos y deteriorantes de los alimentos, alta resistencia a condiciones ácidas y prevalencia a lo largo del proceso de maduración de un producto cárnico fermentado (chorizo tipo español) del que fue aislada previamente por nuestro grupo [Juárez-Castelán *et al.*, 2019]. Por tanto, nuestro objetivo fue evaluar las características probióticas de la cepa *P. pentosaceus* 1101 e identificar aquellas proteínas implicadas en la resistencia y adaptación a la acidez y a las sales biliares, con el fin de obtener información sobre los mecanismos que regulan la supervivencia de esta cepa a las condiciones del TG para un posible uso probiótico, para lo cual decidimos realizar un análisis proteómico mediante LC-MS/MS empleando la técnica *Label-free*. Además, se evaluó su capacidad inhibitoria y actividad proteolítica a diferentes valores de pH ya que estas condiciones pueden inducir cambios en el metabolismo celular.

7 MARCO TEÓRICO

7.1 Bacterias ácido lácticas

Las BAL comprenden un diverso grupo de microorganismos Gram-positivos, catalasa negativos, quimiorganotróficos (que crecen únicamente en medios complejos), no móviles, con morfología bacilar o cocoide, no esporulados, con contenido de guanina y citocina (G+C) de 33-55%, que incluyen especies de los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* [Monroy *et al.*, 2009; Stiles y Holzapfel, 1997] y *Bifidobacterium* con contenido de G+C de 57-65% [Sgorbati *et al.*, 1995].

Las BAL son un grupo capaz de fermentar carbohidratos para formar principalmente ácido láctico (fermentación homoláctica) y para producir además acetato, etanol, CO₂, formiato o

succinato (fermentación heteroláctica). La **figura 1** muestra las tres principales vías asociadas con el metabolismo de las hexosas en las BAL, la fermentación homoláctica sigue la familiar vía Embden-Meyerhof-Parnas para glucólisis la cual se caracteriza por el papel clave de la enzima aldolasa, comparable con la función realizada por fosfoacetolasa en las otras dos vías. La vía de la 6-fosfogluconato que produce CO₂, lactato, acetato y en algunos casos etanol se encuentra en microorganismos que muestran el tipo de fermentación heteroláctica, excepto para bifidobacterias la cuales utilizan la vía Bifidus. [Holzapfel y Wood, 2012].

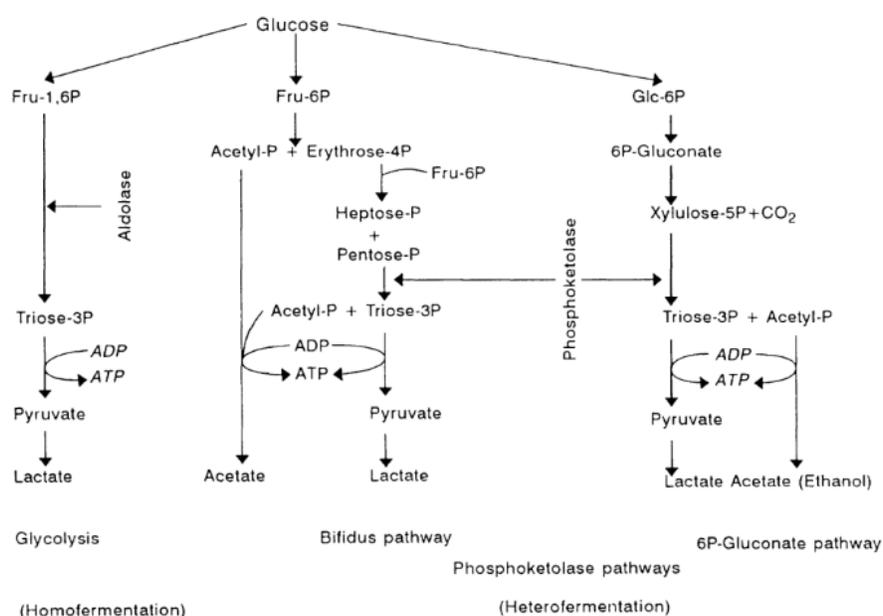


Figura 1. Presentación esquemática de las principales vías de fermentación de la hexosa en las BAL [Holzapfel y Wood, 2012].

7.2 Las BAL como probióticos

Un probiótico es un cultivo de microorganismos vivos, principalmente BAL o bifidobacterias, que afecta de manera benéfica la salud del huésped cuando se ingiere en cantidades suficientes. La colonización del intestino por bacterias probióticas previene el crecimiento de bacterias dañinas por exclusión competitiva, modulación del sistema inmune y por la producción de ácidos orgánicos y compuestos antimicrobianos [Fuller, 1989; Mogensen, 1995; Bao *et al.*, 2010]. Las BAL son residentes normales del tracto

gastrointestinal, el número de BAL en el estómago es de <3 log UFC/ml, en el íleon 2-5 log UFC/g y en el colon 4-9 log UFC/g [Gorjbach *et al.*, 1967] *et al.*

Se ha informado que las condiciones para que las BAL se utilicen como probióticos incluyen mínimamente lo siguiente: a) deben reconocerse como seguras (GRAS), b) deben ser tolerantes al ácido y la bilis y c) deben producir sustancias antimicrobianas como ácido láctico y bacteriocinas, entre otros [Pennacchia *et al.*, 2006]. Además, deben poseer la capacidad de sobrevivir en los productos con un número suficiente durante su producción y almacenamiento [Bao *et al.*, 2010] y tener la capacidad de adherirse a la mucosidad intestinal, a las células epiteliales, auto-agregación y co-agregación para formar una barrera que bloquee la colonización por patógenos *et al.*[Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013] ya que estas propiedades de auto y co-agregación se han relacionado con la capacidad de interactuar estrechamente con bacterias indeseables [Ehrmann *et al.*, 2002]

7.2.1 Resistencia a acidez y sales biliares

Los probióticos comienzan su acción en el tracto gastrointestinal siendo capaces de sobrevivir un pH ácido en el estómago y posteriormente resisten los ácidos biliares al comienzo del intestino delgado [Salminen *et al.*, 1996]. El pH del HCl excretado en el estómago es de 0.9. Sin embargo, por la digestión de alimentos se eleva el valor del pH al nivel de pH 3. Después de la ingestión de alimentos, el estómago tarda 2-4 h en vaciarse. Las sales biliares se sintetizan a partir del colesterol en el hígado, se almacenan en la vesícula biliar y se liberan en el intestino delgado después de la ingestión de lípidos. Estas sales biliares que actúan como detergente son críticas en la sobrevivencia de los microorganismos ya que sus membranas celulares están compuestas de lípidos y ácidos grasos. Sin embargo, algunos microorganismos pueden hidrolizar las sales biliares con la enzima hidrolasa de sal biliar, disminuyendo su solubilidad y por tanto debilitando su efecto detergente [Erkkilä y Petäjä, 2000; Hofmann y Mysels, 1992].

Las cepas de BAL tienen diferentes capacidades en la supervivencia de la acidez, como lo indican los resultados de Arief *et al.*, 2015, debido a que son afectadas específicamente por los mecanismos de homeostasis de pH, los tres sistemas principales involucrados en la homeostasis de pH de BAL son el sistema de arginina deaminasa, la bomba de protones H⁺-ATPasa y el sistema de glutamato descarboxilasa [Cotter y Hill, 2003].

El mecanismo de inhibición del ácido láctico a la célula bacteriana, tiene propiedades hidrofóbicas, facilitando la difusión en forma de protones en la célula a través de la membrana celular. Como resultado, el pH intracelular es más alto que el pH extracelular, [Naidu, 2000]. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma, interfiriendo con funciones celulares, como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, incremento de protones en el interior celular excediendo la capacidad tampón del citoplasma, provocando el transporte hacia el exterior mediante bomba de protones, agotando las reservas energéticas de la célula, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, esto causa desnaturalización de proteínas y desestabilización de componentes estructurales y funcionales, interfiriendo así con la viabilidad celular [Vásquez, *et al.*, 2009].

A pesar de que las bacterias son sensibles al pH ácido del estómago, algunas BAL pueden sobrevivir y crecer a ese pH relativamente bajo porque tienen un sistema que transporta simultáneamente ácido láctico y protones al exterior de la célula [Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013].

7.2.2 Propiedades de adherencia

Un criterio principal para la selección de cepas probióticas es la capacidad de adherirse a la superficie intestinal ya que se requiere adherencia al moco intestinal para la colonización y la actividad antagonista contra enteropatógenos. Al llegar al intestino, una cepa probiótica debe fijarse a las puntas de las microvellosidades y luego adherirse al moco para evitar ser arrastrado por el peristaltismo [Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013].

La afinidad de las bacterias por solventes orgánicos como cloroformo y hexano, indica sus propiedades de la superficie celular, la afinidad por el hexano (disolvente no polar) demuestra la superficie hidrofóbica característica de la bacteria, y la afinidad por el cloroformo (disolvente ácido polar) describe la propiedad de donante de electrones de la superficie celular bacteriana, que se atribuye a los grupos carboxílicos y a las interacciones ácido-base de Lewis [Cebeci y Gürakan, 2003]; se ha sugerido que las células bacterianas con alta hidrofobicidad tienden a formar fuertes interacciones con las células musculares o se adhieren fuertemente a las células epiteliales [Doyle *et al.*, 2006; Baig *et al.*, 2021].

Las BAL probióticas tienen la capacidad de formar un agregado articular consigo mismas (auto-agregación) y con bacterias patógenas (co-agregación) [Bao *et al.*, 2010]. Se ha informado que la capacidad de auto-agregación se correlaciona con la adherencia, que es un requisito previo para la colonización del tracto gastrointestinal y la infección por patógenos; la co-agregación, por el contrario, está vinculada a la capacidad de interactuar estrechamente con los patógenos. Por lo que la capacidad de co-agregación, adherirse a las células epiteliales HEp-2, junto con la hidrofobicidad de la superficie celular y la capacidad de agruparse con cepas patógenas se pueden utilizar para la selección preliminar y la identificación de bacterias probióticas con aplicaciones potenciales en sistemas humanos y animales [Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013].

7.2.3 Resistencia a antibióticos

Las bacterias probióticas deben ser caracterizadas y probadas como seguras para la salud de los consumidores a través de múltiples análisis de seguridad, incluyendo la resistencia a los antibióticos [Jacobsen *et al.*, 1999]. El microbioma intestinal es un reservorio para la posible propagación de genes de resistencia de los comensales a los patógenos, lo que se denomina resistoma intestinal. En la actualidad, se discute hasta qué punto los probióticos modulan el microbioma y su efecto sobre el resistoma no está claro ya que existen hallazgos que sugieren efectos opuestos de los probióticos en el resistoma, específicos para cada persona y dependientes de los antibióticos, cuya contribución a la propagación de los genes de resistencia antimicrobiana a lo largo del tracto gastrointestinal humano merece más estudios [Montassier *et al.*, 2021].

La resistencia antimicrobiana a los antibióticos es el resultado de la expresión de enzimas inactivadoras de antibióticos y de mecanismos no enzimáticos. Ambos pueden ser expresados intrínsecamente por una especie dada (genes cromosómicos), o adquiridos por un subconjunto de cepas como consecuencia de dos eventos genéticos distintos, aunque no mutuamente excluyentes: mutaciones en los genes cromosómicos que dan lugar a un aumento de la expresión de mecanismos de resistencia intrínsecos, alteraciones de la permeabilidad por pérdida de porinas de la membrana externa y transferencia horizontal de elementos

genéticos móviles portadores de genes de resistencia, en particular plásmidos que codifican betalactamasas [Ruppé *et al.*, 2015].

Las BAL muestran susceptibilidad a piperacilina y para todos los demás antibióticos existe resistencia clínica, excepto para la amoxicilina, *Lactobacillus* y *Leuconostoc* spp., muestran resistencia a vancomicina mientras que *Lactococcus* y *Enterococcus* son susceptibles; la impermeabilidad de la pared celular parece ser el principal mecanismo de resistencia a penicilinas y cefalosporinas, ya que las BAL carecen de transporte de electrones mediado por citocromo, sin embargo, la cooperación de mecanismos inespecíficos, como los transportadores de múltiples fármacos y los sistemas autolíticos defectuosos de la pared celular, pueden explicar las diferencias en la resistencia entre cepas [Flórez *et al.*, 2005]

7.3 Compuestos antimicrobianos sintetizados por BAL

La utilización de los carbohidratos disponibles en el alimento y la reducción del pH a causa de los ácidos orgánicos producidos, son el principal mecanismo de antagonismo microbiano de las BAL. Se sabe también que estas bacterias producen otras sustancias antagonistas tales como el diacetilo, peróxido de hidrógeno, radicales libres, acetaldehído, isómeros D de aminoácidos, compuestos no proteicos de bajo peso molecular [Dabés, *et al.*, 2001], PGH, bacteriocinas y péptidos antimicrobianos como proteínas ribosomales [Heilbronner *et al.*, 2021]. La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos y del pH es complementaria, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. interfiriendo con funciones celulares, como la translocación de sustrato y la fosforilación oxidativa, incremento de protones en el interior celular excediendo la capacidad tampón del citoplasma, provocando el transporte hacia el exterior mediante bomba de protones, agotando las reservas energéticas de la célula, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, esto causa desnaturalización de proteínas y desestabilización de componentes estructurales y funcionales, interfiriendo así con la viabilidad celular [Vásquez, *et al.*, 2009].

El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) funciona como un oxidante produciendo radicales libres que atacan los componentes celulares esenciales, lípidos, proteínas y DNA. La acumulación del H₂O₂ en los medios de cultivo, se debe a que las BAL, en general no poseen catalasa.

Las bacteriocinas son péptidos con actividad antimicrobiana producidos por síntesis ribosomal; existen numerosas bacteriocinas y cada una tiene espectros de inhibición particulares, actuando no solo frente a bacterias estrechamente relacionadas sino que también pueden afectar a otras especies bacterianas, hongos y algunos parásitos, característica que es aprovechada para la manipulación de poblaciones bacterianas a nivel de tracto digestivo con el fin de excluir patógenos, mejorar la digestibilidad e incrementar la actividad inmunológica de muchas especies animales [Monroy *et al.*, 2009]. Las bacteriocinas de BAL son generalmente estables a pH ácido o neutro, indicando una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen [Gutierrez Ramírez *et al.*, 2005].

Se han reportado más de 230 bacteriocinas en bases de datos como BACTIBASE <http://bactibase.pfba-lab-tun.org>. Klaenhammer, 1993 propuso una clasificación en cuatro grupos (Clase I, Clase II, Clase III y Clase IV) acorde a su proceso de síntesis, modificaciones postraduccionales, peso molecular y estructura; aunque recientemente se han propuesto otros esquemas de sub-clasificación que consideran características genómicas [Alvarez-Sieiro *et al.*, 2016]. Las bacteriocinas de la clase IIa o pediocinas son un grupo de bacteriocinas de bajo peso molecular, estables a los tratamientos térmicos y producidos principalmente por bacterias del género *Pediococcus*. Dentro de su secuencia de aminoácidos contienen una secuencia N-terminal conservada YGNGVXCXXXXCXV, con dos residuos de cisteína unidos mediante un enlace disulfuro y cuyo gen estructural *pedA* se encuentra asociado a otros genes de inmunidad y transporte como *pedB*, the *pedC* and *pedD*. Dentro de las bacteriocinas de la clase II, la Pediocina A es una de las de mayor interés por su capacidad de acción contra *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *Pseudomonas*. Algunos ejemplos de productos comerciales con esta bacteriocina incluyen a ALTA® (Kerry Bioscience) y Fargo 23® (Quest International) como conservadores en productos vegetales y cárnicos [Yousef *et al.*, 1991; López-Cuellar *et al.*, 2016; López-Arvizu *et al.*, 2019].

Las BAL también son capaces de producir PGH que escinden al peptidoglicano de diferentes formas; basándose en su sitio de corte, se clasifican como N-acetilmuramidasa (lisozimas/muramidasa), N-acetilglucosaminidasa, N-acetilmuramil-L-alanina amidasa,

endopeptidasas y transglicosilasas. Las endopeptidasas escinden el enlace peptídico, las N-acetilmuramil-L-alanina amidasas escinden el enlace entre el MurNAc y el primer aminoácido del enlace peptídico, como su nombre indica y las transglicosilasas escinden los enlaces entre los dos glicanos principales [Badiger, 2021]. El motivo de la lisina (LysM) está presente en las PGH bacterianas y en las peptidasas, quitinasas, esterases y reductasas. Los LysM están presentes en los dominios N y C-terminal de las proteínas y en la parte central, posiblemente conectando dos dominios (catalíticos). Se ha demostrado que la unión de ciertas LysM a las células de las bacterias Gram-positivas que se unen de forma no covalente a la pared celular y son responsables de la lisis de las células, se produce en sitios específicos, ya que la unión en otros lugares se ve obstaculizada por la presencia de otros componentes de la pared celular, como los ácidos lipoteicoicos [Buist *et al.*, 2008].

7.4 Proteínas de choque térmico

Se ha demostrado que las proteínas pequeñas de choque térmico HSP, por sus siglas en inglés, interactúan con los lípidos (lipochaperonas) y modulan el estado físico de las membranas en todas las especies de BAL, la respuesta al choque térmico es una respuesta altamente conservada a condiciones de estrés ambiental desafiantes y las HSP son fundamentales para el mantenimiento de la integridad celular en condiciones de estrés, son las principales responsables de mantener la homeostasis proteica celular a través de su actividad chaperona, ayudando al ensamblaje y plegamiento de las proteínas e induciendo su degradación tras un daño irreversible [Csoboz *et al.*, 2022].

Su estructura se caracteriza por un bajo peso molecular (12-43 kDa) y la presencia de un dominio central de α -cristalina altamente conservado (aproximadamente 100 aminoácidos), sus propiedades chaperonas parecen estar estrechamente relacionadas con su capacidad para formar estructuras cuaternarias oligoméricas de diferentes tamaños que encierran el sustrato desplegado, lo protegen del entorno externo y de la agregación/precipitación [Rocchetti *et al.*, 2022].

7.5 Las BAL como cultivos iniciadores en productos cárnicos

Los cultivos iniciadores se han desarrollado en la industria de la carne para reducir los tiempos de fermentación, asegurando bajos contenidos de nitrato y nitrito residuales en el producto final y estandarizar las características organolépticas. Puede observarse que la mayoría de los cultivos iniciadores disponibles en el mercado son mezclas de una cepa de BAL y una cepa del género *estafilococos* y / o *micrococos* que poseen la actividad nitrato reductasa [Hugas y Monfort, 1997].

Las BAL se agregan entonces como inóculo natural o como cultivos iniciadores para favorecer el proceso de fermentación en productos cárnicos ya que provocan cambios en el olor, el sabor y la textura, además de su acción conservante; cuando el valor de pH disminuye (5.9-4.6) por la producción de ácido láctico como resultado de la utilización de carbohidratos, el desarrollo del color ocurre bajo dichas condiciones ácidas, el óxido nítrico se produce a partir del nitrito y luego puede reaccionar con la mioglobina. Finalmente, la inhibición de bacterias patógenas y de descomposición es una consecuencia de la acumulación del ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, etanol, amonio, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, antibióticos y bacteriocinas [Hugas y Monfort, 1997].

Se han utilizado las BAL como cultivos bioprotectores tanto para productos cárnicos cocidos como productos cárnicos fermentados secos, en los productos cárnicos secos el cultivo iniciador se vuelve dominante cambiando el ambiente para garantizar la calidad microbiológica y prevenir el crecimiento de microorganismos indeseables; en los productos cárnicos cocidos se necesita un procesamiento térmico para desarrollar textura y destruir las formas vegetativas para asegurar la vida útil adecuada, por lo cual se requiere el uso de BAL termotolerantes como cultivos iniciadores [Pérez-Chabela *et al.*, 2008].

Se ha estudiado el efecto de BAL termotolerantes en productos cárnicos cocidos inoculadas en forma de células libres, como cultivo bioconservador y encapsuladas en seco; los autores reportaron que las BAL mejoraron la textura de salchichas bajas en grasa que excretan exopolisacáridos y que la capacidad termotolerante de estas BAL podría permitir su inoculación en alimentos procesados por calor como salchichas cocidas, convirtiéndose en la flora dominante durante el almacenamiento en frío envasado al vacío, actuando como agentes biopreservantes [Ramírez-Chavarín *et al.*, 2013].

7.6 Estudios de análisis proteómicos y genómicos en BAL

Las tecnologías "ómicas" son el estudio a gran escala de genes transcritos y proteínas. La genómica unicelular ha permitido la secuenciación del genoma de células individuales de bacterias y el análisis proteómico ha servido para monitorizar los niveles de expresión global de proteínas producidas simultáneamente por una bacteria, o en condiciones específicas por parte de las BAL [Aires& Butel, 2011]; ya que implican la separación e identificación de las proteínas que se expresan de forma diferencial en comparación con las que se expresan en condiciones normales. La identificación de proteínas sensibles al estrés ayuda a comprender redes moleculares complejas implicadas en la adaptación y función durante el estrés [Mbye *et al.*, 2020].

La proteómica se basa en dos estrategias principales para la separación de proteínas: la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) y los procedimientos de fraccionamiento en masa o sin gel basados en la separación por cromatografía líquida (LC). Ambas estrategias se basan en la espectrometría de masas (MS) para la identificación. En los métodos basados en gel, las proteínas intactas se separan antes de una digestión enzimática en gel para generar péptidos proteolíticos, que posteriormente se identifican por MS. Los métodos de LC pueden realizarse con proteínas intactas o péptidos proteolíticos derivados de una muestra compleja digerida [Aires& Butel, 2011].

En la proteómica cuantitativa existe una tendencia a complementar el enfoque de la 2D-PAGE mediante las estrategias shotgun o MudPIT (tecnología de identificación multidimensional de proteínas) [Guillaume *et al.*, 2009], no es la proteína intacta la que se separa e identifica, en su lugar, las proteínas se escinden en péptidos mediante enzimas proteolíticas y estos péptidos se separan posteriormente y se someten a análisis MS/MS [Aires& Butel, 2011]. El método LC-MS/MS, puede subdividirse en técnicas de etiquetado con isótopos estables, fluorescente y recuento espectral [Guillaume *et al.*, 2009], sin embargo, los investigadores recurren cada vez más a técnicas de proteómica shotgun label-free basadas en corrientes iónicas para obtener resultados más rápidos, limpios y sencillos. La proteómica cuantitativa label-free basada en MS se divide en dos categorías de mediciones, en la primera se encuentran las mediciones de los cambios en la intensidad de los picos del mismo péptido, la segunda se basa en la comparación del recuento espectral de

las mismas proteínas identificadas superponiendo las series de LC-MS/MS de las muestras de control y de caso [Guillaume *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2009].

La proteómica desempeña también un papel fundamental en la vinculación del genoma y el transcriptoma con posibles funciones biológicas. En lo que respecta a los probióticos, la proteómica comparativa puede utilizarse en la identificación de proteínas expresadas diferencialmente dentro de la misma cepa en diferentes condiciones, arrojando luz sobre los factores de adaptación bacteriana a las condiciones del tracto gastrointestinal, como la bilis, el pH ácido y la adhesión a la mucosa intestinal [Hamon *et al.*, 2011].

La combinación de enfoques como la genómica, la proteómica y la bioinformática nos permite obtener información más precisa y detallada sobre las proteínas del estrés para la utilización de BAL en la ciencia de los alimentos [Mbye *et al.*, 2020].

7.7 Género *Pediococcus*

Como resultado de su asociación con el deterioro de la cerveza, *Pediococcus* fue de las primeras bacterias estudiadas por Louis Pasteur, su morfología de tétradas y esférica sirvió como clave característica para su reconocimiento temprano, siendo las únicas BAL que se dividían en dos planos para producir tétradas o pares, pero los cambios taxonómicos han aumentado el número de géneros formadores de tétradas a tres. Los pediococos son homofermentativos o heterofermentativos facultativos (*P. acidilactici* y *P. pentosaceus*), con la excepción de *L. dextrinicus* que produce ácido L (+) -láctico, todas las especies producen DL - lactato a partir de glucosa. Los pediococos de la cerveza y de origen vegetal se incluyeron inicialmente en una especie como *P. cerevisiur*, pero los estudios posteriores sobre aislamiento de éstas dos fuentes se mostraron diferentes entre sí y fueron asignados a *P. dumnosus* y *P. pentosaceus*, respectivamente. El hábitat común de estos microorganismos son la cerveza, vino, sidra, ensilados, chucrut, vegetales, salchichas fermentadas, leche y productos lácteos, salsa de soja y salmueras encurtidas [Stiles y Holzapfel, 1997]. Algunas especies exhiben tolerancia extrema a la temperatura, pH y NaCl [Holzapfel y Wood, 2012]. La **figura 2** muestra la relación filogenética (gen *ARNr16S*) entre las principales especies de BAL que han sido evaluadas como inóculos. La similitud genética en este grupo es evidente, la línea de puntos separa las especies heterofermentativos obligados (parte superior) de las

homofermentativas (parte inferior), y las especies heterofermentativas facultativas están presentes en ambas partes del grupo filogenético [Carvalho *et al.*, 2021].

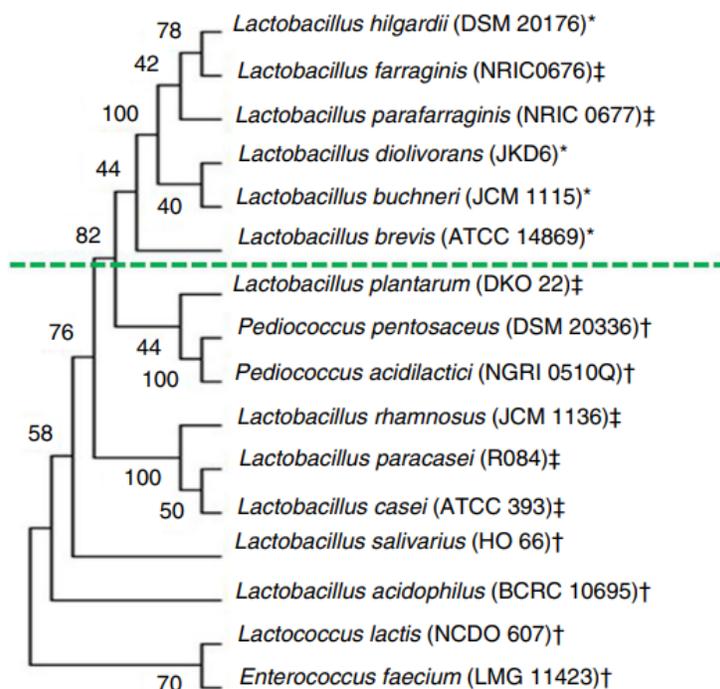


Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud que muestra la relación filogenética de las especies de bacterias lácticas estudiadas como inoculantes utilizando secuencias del gen *ARNr 16S*. †Homofermentativo; *Heterofermentativo obligado; ‡Heterofermentativo Facultativo [Carvalho *et al.*, 2021].

8 ANTECEDENTES

8.1 Estudios del potencial probiótico de *Pediococcus pentosaceus* como cultivo iniciador y en carne

El desarrollo de BAL como cultivos iniciadores para alimentos funcionales es una tendencia en la tecnología de procesamiento de alimentos [Arief *et al.*, 2015]. Las BAL con propiedades probióticas también pueden utilizarse como cultivos iniciadores en productos cárnicos probióticos. Un cultivo iniciador con propiedades probióticas en productos cárnicos, además de afectar la textura, el sabor y la vida útil, debe de estar bien adaptado al entorno heterogéneo

que se encuentra en ellos, debe ser fuerte competidor contra la microflora natural de la carne y crecer en un número que tenga efecto benéfico sobre la salud [Erkkilä y Petäjä, 2000]. Es importante determinar y caracterizar las propiedades probióticas de BAL como cultivos iniciadores de productos cárnicos ya que es de utilidad para formular productos cárnicos secos o cocidos en caso de que además cuenten con termotolerancia [Ramirez-Chavarin *et al.*, 2013].

Se ha determinado la supervivencia de *P. pentosaceus* aislado de cultivos comerciales iniciadores de carne en condiciones ácidas similares a las del tracto gastrointestinal e intestino delgado. Erkkilä y Petäjä, en el 2000 indican en sus resultados que 0.3% es una concentración crítica de sales biliares para seleccionar cepas tolerantes; *P. pentosaceus* sobrevive a pH 3 y pH 5 con 0.3% de sales biliares. En condiciones ácidas, así como en presencia de sales biliares, el número de *P. pentosaceus* disminuyó en aproximadamente 1 unidad logarítmica, lo que indica que sobrevivió hasta un 10%.

Ramirez-Chavarin *et al.*, en 2013 reportaron cinco cepas de *P. pentosaceus* termotolerantes aisladas de productos cárnicos cocidos que mostraron todas un buen crecimiento después de 4 h de incubación a pH 4 y 5 y una cepa después de 3 h de incubación a pH 3; fueron intolerantes a las condiciones de pH 0.5-2, sin embargo los autores indicaron que existen sistemas como la microencapsulación que ayudan a mejorar la supervivencia de los probióticos cuando se exponen a condiciones ácidas, sales biliares y tratamientos térmicos. Tres de las cepas resistieron el jugo gástrico simulado durante 90 minutos, tiempo que es suficiente para alcanzar su sitio de acción en el intestino, también cuatro cepas crecieron en concentraciones biliares de hasta 2% y todas crecieron en ácido taurocólico. En general las cepas tuvieron un buen porcentaje de co-agregación con *E. coli*, y *Salmonella* lo que indicó que podrían funcionar para eliminar las bacterias patógenas del tracto gastrointestinal, además exhibieron una alta capacidad de autoagregación a las 24 h y cumplieron con el criterio de adherencia a células HEp-2 (derivada de células de cáncer de faringe humano); Este estudio indica que la capacidad termotolerante inherente más la propiedad probiótica demostrada de *P. pentosaceus* lo perfilan como un cultivo bioprotector viable que puede inocularse en productos cárnicos cocidos antes del procesamiento térmico, para garantizar su prevalencia como flora probiótica dominante durante y antes de la vida útil.

También Vidhyasagar y Jeevaratnam en 2013 evaluaron seis cepas de *P. pentosaceus* para determinar las propiedades probióticas *in vitro*. Llegaron a la conclusión de que las cepas exhibían inhibición del crecimiento de patógenos intestinales Gram positivos y Gram negativos y podían usarse en alimentos funcionales como una cepa probiótica.

Arief *et al.*, en 2015 realizaron pruebas de acidez a dos cepas de *P. pentosaceus* aisladas de carne fresca indonesia, obtuvieron una supervivencia del 46% a pH 2.0, 75% con pH 2.5 y 84% a pH 3.2 con una población inicial de 10^9 - 10^{11} UFC mL⁻¹.

Por su parte Chen *et al.* en 2017 reportaron que *P. pentosaceus* posee propiedades biológicas potencialmente superiores, especialmente mejorando el rendimiento del crecimiento, el equilibrio de la microbiota intestinal, la calidad de la carne y el microambiente en pollos, y disminuyendo el contenido de amoníaco en el medio.

Hernández-Alcántara *et al.*, en 2018 reportaron propiedades probióticas deseables de cinco cepas de *P. pentosaceus* termotolerantes, aisladas de productos cárnicos cocidos, en condiciones de estrés gástrico, la viabilidad de las cepas disminuyó más de cinco veces, mientras que en la exposición al estrés del intestino delgado no afectó drásticamente la supervivencia de ninguna de las cepas que pudieron crecer en presencia de sales biliares al 0.3%, presentaron un perfil superficial hidrófilo, con mayor afinidad por el cloroformo que por el xileno. Las cepas mostraron altos niveles de autoagregación, así como co-agregación con patógenos bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos y adherencia a células humanas Caco-2 de 2% -5%.

Finalmente, Juárez-Castelán *et al.*, en 2019 aislaron de un chorizo tipo español BAL responsables de la acidificación durante el proceso de maduración, que presentaron actividad lipolítica, proteolítica y antagonica; con estas 15 cepas aisladas en el grupo de trabajo se comenzó este estudio.

9 JUSTIFICACIÓN

Las BAL poseen mecanismos de antagonismo microbiano, tales como la reducción del pH, producción de diacetilo, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, compuestos no proteicos de bajo peso molecular y bacteriocinas, entre otros; éstas características aumentan el interés por las bacterias lácticas y / o sus metabolitos, ya que pueden ser utilizados como biopreservantes en los alimentos, lo que confiere mayor seguridad al consumidor, que cada vez prefiere

productos libres de conservantes químicos y microbiológicamente seguros [Dabés, *et al.*, 2001].

Publicaciones han informado de cepas del género *Pediococcus* que se podría utilizar como cultivos bioprotectoras para los procesos de fabricación de alimentos en los intentos de controlar *L. monocytogenes* [Todorov y Dicks, 2005].

Pediococcus pentosaceus ha sido aislada de diversos productos cárnicos y puede tener un potencial uso como cultivo iniciador y en carne; ya que se han probado diferentes cepas que pertenecen a este género y se utilizan como bacterias probióticas [HernándezAlcántara *et al.*, 2018], es por ello de gran interés describir la termoresistencia, actividad antimicrobiana y propiedades probióticas de *Pediococcus pentosaceus*.

Gracias a la considerable cantidad de información genómica de BAL disponible hoy en día en bases de datos, los estudios ómicos son los enfoques de investigación primordiales para estudiar la expresión de genes y proteínas con mayor detalle, para comprender y estudiar sus funciones [Weckx *et al.*, 2010; Andreevskaya *et al.*, 2015].

Se conoce bien sobre los efectos beneficiosos para la salud y conservación de productos cárnicos de las BAL que se utilizan como probióticos y cultivos iniciadores, pero los mecanismos moleculares subyacentes siguen siendo poco conocidos. Por tanto, identificar, investigar, y describir las proteínas y factores de adaptación involucrados tanto en las características tecnológicas como de potencial probiótico en relación con la tolerancia a las condiciones gastrointestinales y como cultivo iniciador de *Pediococcus pentosaceus* 1101 es de especial interés, ya que ayudará a seleccionar las cepas que tienen más posibilidades de éxito y aportará información sobre el uso que se le puede dar a esta.

10 HIPÓTESIS.

El análisis proteómico de la cepa 1101 de *Pediococcus pentosaceus* permitirá identificar y describir las proteínas involucradas en la respuesta al estrés ácido y de sales biliares, que puede ser un factor clave a la hora de la adaptación de los probióticos en el tracto gastrointestinal.

11 OBJETIVOS

11.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el potencial probiótico de la cepa y explorar la aplicación del análisis proteómico mediante espectrometría de masas (MS/MS) para identificar e investigar las proteínas de *Pediococcus pentosaceus* 1101 involucradas en el proceso de tolerancia a las condiciones gastrointestinales.

11.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la cepa de estudio mediante dos diferentes técnicas moleculares: *ARNr 16S* y MALDI-Biotyper.
- Ensamblar el genoma de *Pediococcus pentosaceus* 1101.
- Determinar la actividad antagónica de *Pediococcus pentosaceus* 1101.
- Determinar la actividad inhibitoria y proteolítica de *Pediococcus pentosaceus* 1101 bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de NaCl.
- Evaluar la resistencia de *Pediococcus pentosaceus* 1101 a antibióticos.
- Evaluar la tolerancia a la acidez y a las sales biliares de *Pediococcus pentosaceus* 1101: parámetros cinéticos y tasa de supervivencia.
- Evaluar propiedades de adherencia celular de *Pediococcus pentosaceus* 1101: hidrofobicidad, auto-agregación y co-agregación.
- Determinar el perfil de proteínas de *Pediococcus pentosaceus* 1101 expuesto bajo condiciones de control y gastrointestinales mediante SDS-PAGE y zimograma.
- Realizar el análisis proteómico de *Pediococcus pentosaceus* 1101 expuesto bajo condiciones de control y gastrointestinales mediante espectrometría de masas (MS/MS).

- Identificar antimicrobiano de origen proteico de *Pediococcus pentosaceus* 1101 expuesto bajo condiciones de control y gastrointestinales.
- Identificar proteínas involucradas en la respuesta al estrés por acidez y sales biliares de *Pediococcus pentosaceus* 1101 expuesto bajo condiciones gastrointestinales.

12 METODOLOGÍA

12.1 Propagación de la cepa

La cepa de estudio fue seleccionada de entre una colección de 15 cepas (**Anexo 17.1**) aisladas previamente por nuestro grupo de trabajo a partir de un producto cárnico fermentado (chorizo tipo español) [Juárez-Castelán *et al.*, 2019]. La cepa bacteriana se preparó mediante la incubación con caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe, BD Difco, EE.UU.; 37 °C durante 24 h), luego se añadió glicerol al 50%, se selló y se conservó a -80 °C. Antes del análisis, la cepa de estudio se reactivó en medio CGB (caldo de caseína y glucosa, BD Bioxon, Cuautitlán Izcalli, Mex., México) y se incubó durante 12 h a 37 °C en condiciones estáticas. Por otra parte, todos los reactivos se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU.) a menos que se especifique lo contrario.

12.2 Identificación bacteriana

La identidad de la cepa *P. pentosaceus* 1101 se confirmó mediante la secuenciación del gen ARNr 16S. El ADN, para lo cual se extrajo el ADN de un pellet centrifugado de un cultivo de 18 h utilizando el kit de purificación de ADN genómico Wizard (Promega, Madison, WI, EE.UU.) siguiendo las especificaciones del fabricante. La integridad del ADN extraído se verificó por electroforesis utilizando un gel de agarosa al 0.8% (p/v), tampón TAE (Tris-acetato 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0). El gen del ARNr 16S se amplificó mediante la técnica de PCR con la enzima Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific, MA, USA) y cebadores universales para el gen del ARNr 16S (27f-5' GTT TGA TCM TGG CTC AG 3' y 1492R-5' TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Las condiciones se programaron en un

termociclador EP-Gradient (Eppendorf, Mas-tercycler EP, CA, USA). El producto de la PCR fue purificado y secuenciado por Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) y se compararon con la base de datos Refseq del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI).

La identidad de la cepa fue corroborada por MALDI-Biotyper en el Laboratorio Divisional de Espectrometría de Masas de la Universidad Autónoma Metropolitana mediante el método de extracción con etanol y ácido fórmico [Mirás, 2019]. Las colonias frescas individuales aisladas de las placas de MRS-Agar se colocaron en viales de 1.5 mL y se suspendieron en 300 μ L de agua desionizada, seguido de la adición de 900 μ L de etanol, se añadió secuencialmente ácido fórmico al 70% y 1 μ L de acetonitrilo para la inactivación, ruptura y precipitación de la membrana celular, y se centrifugó ($12.096 \times g$) durante 2 min. Después de la centrifugación, se colocó 1 μ L del sobrenadante en una placa de acero (Bruker, Alemania) con 1 μ L de la matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico; Sigma-Aldrich, MA, USA). El análisis se realizó en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF MS Autoflex speed (Bruker Daltonics, Leipzig, Alemania) utilizando la herramienta MALDI Biotyper y los datos se compararon con la base de datos MBT Compass para asignar géneros y especies.

12.3 Ensamble del genoma

El ADN genómico se extrajo utilizando el kit RiboPure (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, USA). La secuenciación del genoma se realizó con la plataforma Illumina NextSeq y se obtuvo un total de 5.326.286 lecturas emparejadas (2 x 150). El control de la calidad de las lecturas se evaluó con el software FastQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), y se utilizó el programa Trim Galore v0.6.7 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) para quitar adaptadores y bases de mala calidad. El ensamblaje del genoma de *nov* se realizó con el ensamblador SPAdes v3.14.1 [Bankevich *et al.*, 2012]. El genoma de *P. pentosaceus* 1101 fue anotado utilizando el pipeline Prokka v1.14.6 [Seemann, 2014].

12.4 Evaluación de propiedades funcionales y probióticas

Los parámetros probióticos implican la evaluación de la actividad antagonista (37 °C durante 24 h) [Juárez-Castelán, 2019], su cinética de crecimiento (pH 2 y 3 durante 9 h, pH 4.5-7.0 durante 24 h, a 37°C) [Aguilar-Zarate *et al.*, 2014], actividades proteolíticas (tratamiento de cultivo pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7 incubados a 37 °C durante 24 h) [Molin y Ternström, 1982] e inhibitorias (tratamiento de cultivo pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7 incubados a 37 °C durante 24 h) [García-Cano *et al.*, 2014] dentro de un intervalo de pH; su supervivencia a bajo pH y en presencia de sales biliares (pH 2 y 3 durante 1 h y 0.5% (p/v) de sales biliares durante 1 h) [Khan y Kang, 2016; Bao *et al.*, 2010] que se asemejan al tracto gastrointestinal. Así como la evaluación de las propiedades de unión, tales como la hidrofobicidad (1 h a temperatura ambiente) [Hernández-Alcántara *et al.*, 2018; Sánchez y Tromps, 2014] la auto-agregación y la co-agregación (se incubó a temperatura ambiente a diferentes intervalos de tiempo: 0, 2, 4, 6, 20 y 24 h) [Hernández-Alcántara *et al.*, 2018; Collado *et al.*, 2008] y su resistencia a los antibióticos (37 °C durante 24 h) [Sayedboworn *et al.*, 2014].

12.4.1 Actividad antagónica

La actividad antagónica de la cepa se determinó según el método descrito por Juárez-Castelán, 2019, contra microorganismos Gram negativos y Gram positivos (*Escherichia coli* DH5 α GenBank: NZ_JRYM000000000.1, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium ATCC 14028, *Enterococcus faecalis* 1351, *Listeria monocytogenes* 1639, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, y *Weisella viridescens* GenBank: UAM-MG5: MT814884), que se activaron previamente a 37 °C en TSB (Tryptic-Soy-Broth, Difco Laboratories, EE.UU.) durante 24 h. La actividad antagonista se realizó en placas con agar-CGB inoculadas verticalmente con la cepa de estudio 1101 con un hisopo estéril e incubadas a 37 °C durante 24 h. A continuación, los microorganismos de prueba se inocularon perpendicularmente a la cepa estudiada con un hisopo estéril sin tocarse, a unos 3 mm de distancia del crecimiento vertical de la cepa 1101. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. La reacción positiva se indicó por la zona de inhibición próxima al crecimiento de cada cepa ensayada.

12.4.2 Cinéticas de crecimiento a diferentes valores de pH

Los parámetros cinéticos de la cepa 1101 se determinaron midiendo el crecimiento microbiano en diferentes condiciones de pH (2, 3, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7) a una temperatura constante de 37 °C. Se prepararon cultivos de *P. pentosaceus* 1101 de 24 h a 37 °C en caldo MRS en tubos inoculados al 1% con la cepa estudiada, y se ajustó la densidad óptica a un $A_{600\text{nm}}$ de 0.8. Se depositó un volumen de 200 μL en microplacas estériles para cada tratamiento y control, y se registró la absorbancia a 600 nm a intervalos de tiempo de 30 min durante la incubación con agitación en un lector de microplacas Synergy HT (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). Los datos se recogieron utilizando el software Gen 5.11 (BioTek Instruments Inc., Winooski, VT, EE.UU.). Los datos de crecimiento obtenidos se sometieron a un modelo logístico de Verhulst-Pearl [Aguilar-Zarate *et al.*, 2014] con el programa STATISTICA 7, 2004 y los parámetros cinéticos de la tasa de crecimiento (μ), y O.D.max se obtuvieron con la siguiente ecuación:

$$\mathbf{O. D. (t)} = \left[\frac{\mathbf{O.D.max}}{1 - \left(\frac{\mathbf{O.D.max} - \mathbf{O.D.o}}{\mathbf{O.D.o}} \right) \cdot e^{(-\mu t)}} \right] \quad (1)$$

Donde O.D.₀ se refiere al valor de O.D. en el tiempo t=0. Los valores mínimos del error cuadrático se encontraron en función de los parámetros O.D.₀, O.D.max y μ .

El análisis estadístico se realizó con el software NCSS, 2007.

12.4.3 Actividad proteolítica a diferentes valores de pH

Mediante la técnica de placas de agar con leche descremada [Molin y Ternström, 1982] se evaluó la actividad proteolítica de la cepa utilizando placas con agar al 1.5% (BD, Bioxon, Cuautitlán Izcalli, Mex., México) y leche descremada al 1.5% (Svelty, Nestlé, Lagos de Moreno Jal., México) que se prepararon y esterilizaron por separado a 121 °C durante 15 min y 5 min, respectivamente, y se combinaron para el colado de la placa. Una vez que el medio se solidificó, se hicieron una serie de pozos con una pipeta Pasteur estéril, se colocaron en ellos 50 μL de cada tratamiento de cultivo (pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7) y se incubaron las placas a 37 °C durante 24 h. La presencia de un halo alrededor del pozo indicaba una actividad

positiva de la proteasa, indicativa de la degradación de las proteínas, y la actividad se reportó como el diámetro en milímetros del halo.

12.4.4 Actividad inhibitoria a diferentes valores de pH

La prueba de actividad inhibitoria se realizó mediante ensayos de difusión en agar, tal y como describe García-Cano et al., 2014, con algunas modificaciones. Las placas que contenían 15 mL de CGB con 1.5% de agar se dejaron solidificar a temperatura ambiente durante 30 min, y luego se cubrieron con 20 mL de agar CGB al 0.8% previamente inoculado con 140 μ L ($A_{600\text{nm}}$ de 0.3) del microorganismo indicador cultivado durante la noche en TSB en condiciones estáticas durante 18 h a 37 °C. El microorganismo indicador fue *Listeria innocua* ATCC 33090. Tras la solidificación del medio, se hicieron pozos en la segunda capa de agar utilizando la parte posterior de una punta de micropipeta de 1,000 μ L. A continuación, se evaluó la actividad inhibidora del extracto libre de células de *P. pentosaceus* 1101 colocando 100 μ L del sobrenadante libre de células de cada tratamiento de cultivo (pH 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5 y 7) en los pocillos realizados en placas previamente inoculadas con *L. innocua* ATCC 33090. Tras la incubación, la presencia de un halo de inhibición del crecimiento alrededor del pozo indicaba una actividad antimicrobiana positiva y se informaba como la relación del diámetro de la inhibición por mg de proteína. La concentración de proteína del sobrenadante celular obtenido de cada tratamiento se determinó mediante el método de Bradford, 1976, mezclando en una microplaca 160 μ L de muestra y 40 μ L de reactivo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) y midiendo la absorbancia a 595 nm tras 5 min de incubación e interpolando a una curva estándar (**Anexo 17.2**) para determinar la cantidad de proteínas. Se utilizó nisina como control positivo y medio de cultivo sin tratamiento como control negativo.

12.4.5 Supervivencia de *P. pentosaceus* 1101 tras la exposición a pH bajo y sales biliares

La tolerancia al pH bajo se evaluó a partir de un cultivo de 15 h con una absorbancia a 600 nm de 1-1.2 (10^9 UFC/mL) de células de *P. pentosaceus* 1101 durante la fase de crecimiento exponencial. Se tomó un inóculo del 10% para el medio MRS ajustado a pH 2 y 3, se incubó durante 1 h a 37 °C y se utilizó la técnica descrita por Khan y Kang, 2016, para determinar la viabilidad celular (\log_{10} UFC/mL) mediante el recuento en placa de agar-MRS. Se tomó

una muestra de 100 µL del tubo y se depositó en una placa de Petri mediante la técnica de extensión superficial en una placa con perlas de vidrio estériles, y se realizó un recuento en placa inicial y final del cultivo. La tasa logarítmica de supervivencia se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Tasa logarítmica de supervivencia (\%)} = \frac{\log_{10} \text{CFU N1}}{\log_{10} \text{CFU N0}} * 100 \quad (2)$$

donde N1 representa el recuento total de viables tras la incubación con el tratamiento ácido, mientras que N0 representa el recuento total de viables inicial [Bao *et al.*, 2010].

La capacidad de crecimiento de las bacterias en presencia de sales biliares (Bile extract porcine, Sigma-Aldrich, MA, USA) se determinó a partir de un cultivo de 15 h de la cepa 1101 cuando alcanzó su fase exponencial con una absorbancia a 600 nm de 1-1.2 (10⁹ UFC/mL), y se tomó un inóculo al 10% para los tubos con MRS ajustado con 0.5% de bilis porcina (p/v). Para determinar la viabilidad celular se utilizó el mismo protocolo descrito para la acidez; sin embargo, los tubos se inocularon al 10% con MRS ajustado con 0.5% de sales biliares y se incubaron durante 1 h a 37 °C.

12.4.6 Resistencia a antibióticos

El perfil de resistencia frente a catorce antibióticos se determinó utilizando discos Clairo Combi para bacterias Gram-positivas (Arkray Healthcare, Surat, India) según las recomendaciones del proveedor. Se utilizó una suspensión bacteriana de *P. pentosaceus* 1101 correspondiente al estándar 1 de la escala McFarland y se inoculó en placas de agar Mueller-Hinton; el patrón de sensibilidad a los antibióticos se comprobó mediante el método de difusión en agar utilizando los catorce discos de antibióticos diferentes. Tras la incubación a 37 °C durante 24 h, se midieron las zonas de inhibición, incluido el diámetro de los discos (7 mm). Los resultados se expresaron como sensible, S (≥ 21 mm); sensible intermedio, I (16-20 mm) y resistente, R (≤ 15 mm) [Sayedboworn *et al.*, 2014].

12.4.7 Propiedades de adhesión celular

Para todas las pruebas de adhesión bacteriana, se utilizó como control positivo a *Lactobacillus acidophilus* NCFM® proporcionado por Danisco USA Inc, lo que implicó la hidrofobicidad de la superficie celular, capacidades de auto-agregación y co-agregación, ya que se han correlacionado con la capacidad de adhesión a las superficies epiteliales que aumenta su colonización potencial del TG [Sánchez y Tromps, 2014] y pueden emplearse en un cribado preliminar de bacterias probióticas potenciales [Collado *et al.*, 2008].

La adhesión bacteriana a los disolventes como indicador de las propiedades de la superficie celular se realizó según lo descrito por Sánchez [Sánchez y Tromps, 2014], citado en Hernández-Alcántara, 2018. Las células de *P. pentosaceus* 1101 de un cultivo de 15 h en fase exponencial ($DO_{560nm} = 1-1.2$; 10^9 UFC/mL) se recuperaron por centrifugación ($5000 \times g$ durante 30 min) y se lavaron dos veces con PBS (pH 7.2). El pellet resultante se resuspendió para obtener un $A_{560nm} = 0.6-0.7$, se mezcló (v/v) con un disolvente orgánico (hexano o cloroformo) y se agitó enérgicamente con un vórtex durante 30 s. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente, se retiró cuidadosamente la fase acuosa y se midió la absorbancia a 560 nm (A_{560nm}). La hidrofobicidad de las células de *P. pentosaceus* se calculó como

$$H [\%] = [(A_o - A) / A_o] \times 100 \quad (3)$$

donde A_o y A corresponden a la absorbancia antes y después de la extracción con disolventes orgánicos, respectivamente.

La capacidad de auto-agregación de *P. pentosaceus* se determinó según lo descrito por Collado *et al.*, 2008 con modificaciones realizadas por Hernández-Alcántara *et al.*, 2018. Las células bacterianas se volvieron a cubrir por centrifugación y se lavaron dos veces con PBS (pH 7.2), y luego se resuspendieron en el mismo tampón a $A_{600nm} = 0.50 \pm 0.10$ para estandarizar el número inicial de bacterias (10^7-10^8 UFC/mL). A continuación, la suspensión bacteriana se incubó a temperatura ambiente y se sometió a un seguimiento a diferentes

intervalos de tiempo (0, 2, 4, 6, 20 y 24 h). El porcentaje de auto-agregación se expresó como sigue:

$$A [\%] = [(A_o - A_t) / A_o] \times 100 \quad (4)$$

donde A_o representa la absorbancia en 0 h y A_t representa la absorbancia en el intervalo de tiempo t.

Para los ensayos de co-agregación, se prepararon suspensiones bacterianas como se ha descrito anteriormente para el ensayo de auto-agregación. Se mezclaron volúmenes iguales (500 μ L) de *P. pentosaceus* 1101 y *L. monocytogenes* 1639 y se incubaron a temperatura ambiente. Se incubaron suspensiones bacterianas puras (1 mL cada una) en condiciones similares como controles para comprobar la auto-floculación. Se determinó el $A_{600\text{nm}}$ de la mezcla a los tiempos indicados (0, 2, 4, 6, 20 y 24 h), y se calculó el porcentaje de co-agregación según la ecuación de Malik *et al.*, 2003:

$$C [\%] = [(A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}}) - (A_{\text{mix}})] / [(A_{\text{pat}} + A_{\text{probio}})] \times 100 \quad (5)$$

donde A_{pat} y A_{probio} representan la absorbancia de las suspensiones bacterianas independientes a las 0 h y A_{mix} corresponde a la absorbancia de la mezcla bacteriana a los diferentes tiempos ensayados.

12.5 Análisis proteómico de *P. pentosaceus* 1101 expuesto bajo condiciones de control y gastrointestinales

12.5.1 Exposición de la cepa bajo condiciones gastrointestinales

P. pentosaceus 1101 se cultivó en MRS hasta la fase de crecimiento logarítmico tardío (37 °C, 15 h). Las células se recuperaron por centrifugación a $6.271 \times g$ durante 10 min a 4 °C, y se lavaron dos veces con tampón frío PBS 1X (pH 7.2) antes de ser expuestas a los tratamientos. El tratamiento de las condiciones gastrointestinales consistió en la resuspensión de las células

en medio MRS (pH 3.0, con 0.5% (p/v) de sales biliares) y se incubó durante 1 h a 37 °C. El tratamiento control consistió en la resuspensión de las células en MRS (pH 7.0) y en las mismas condiciones. Tras la incubación, las suspensiones celulares se sumergieron rápidamente en un baño de agua helada (< 4 °C) para asegurar el enfriamiento completo de las muestras [Kosin y Rakshit, 2010]. Finalmente, las células de ambos tratamientos se recogieron por centrifugación a $6.271 \times g$ durante 10 min a 4 °C, se sometieron a dos lavados consecutivos con tampón PBS frío (pH 7.2) y se almacenaron a -70 °C para el análisis electroforético o proteómico.

12.5.2 Análisis electroforético por SDS-PAGE y actividad lítica por zimograma

12.5.2.1 Extracción de proteínas

Para extraer todas las proteínas, las células recuperadas se descongelaron a 4 °C y se resuspendieron en tampón de lisis (Tris-HCl 50 M, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 6 µL y un inhibidor de proteasas). A continuación, las suspensiones se colocaron en viales con perlas de vidrio de 2 mm preincubados a 0 °C. Las células se rompieron con un disruptor (Mini-Beadbeater 16, Biospec Products, USA) aplicando 25 ciclos sucesivos de 30 s a 4 °C. Al final de la ruptura mecánica, las suspensiones se sedimentaron a $12.096 \times g$ durante 20 min a 4 °C para separar el sobrenadante de las perlas de vidrio. La fracción de proteínas solubles se recuperó en el sobrenadante, y las proteínas se precipitaron a -20 °C durante 6 h con ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se centrifugaron a $12.096 \times g$ durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó, el pellet de proteínas se lavó dos veces con acetona fría, se centrifugó a $6.271 \times g$ y finalmente se lavó con acetona al 80% [Navarro, 2017]. El pellet de proteínas se resuspendió en tampón (Tris-HCl 5 M, DTT 5 mM, 6 µL de urea 6 M, pH 8.0) para solubilizar y rehidratar las proteínas durante 30 minutos mientras se agitaba a 37 °C y luego se sometió a sonicación (Baño de Ultrasonidos, Branson® CPXH2800, USA) durante 30 minutos a baja frecuencia (40 kHz). La concentración de proteínas se cuantificó mediante el método de Bradford, y la fracción de proteínas solubles se almacenó a -70 °C antes del análisis electroforético.

12.5.2.2 Análisis electroforético

El análisis por SDS-PAGE de las proteínas extraídas se realizó según la técnica descrita por Laemmli, 1970. Las muestras de proteínas se mezclaron con el tampón de carga de muestras 5X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% [p/v] SDS, 24% [v/v] de glicerol y 0.02% de azul de Coomassie). Los extractos que contenían 25 g de proteínas de cada tratamiento se depositaron en un gel de poliacrilamida al 12%. Por otra parte, el ensayo zimográfico se realizó en un gel de 12% T (acrilamida/bisacrilamida) con 0.2% de células liofilizadas de *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 como sustrato, con una reticulación del 2.6% (C). Los geles de concentración se prepararon al 2.6% C y al 4% T. Se utilizó un marcador de masa molecular con un rango de 2-250 kDa (Precision Plus Protein Dual, Xtra Standard, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Los perfiles proteicos obtenidos en los geles de SDS-PAGE y de zimografía se digitalizaron utilizando un sistema de documentación de geles (GelDoc™ XR+, Bio-Rad, Hercules Cal, USA) y se analizaron utilizando el Image-Lab (Ver 6.1, BIO-RAD, Hercules CA, USA). El peso molecular aparente (MW) de cada banda de proteína obtenida de la electroforesis y el zimograma se calculó utilizando el software Gel Doc™ XR+ Imaging System (BIO-RAD, CA, USA), y los pesos aparentes de las bandas se interpolaron utilizando el método de regresión semi-logarítmica que maneja el software utilizando Bio-Rad Dual Xtra como estándar.

12.5.3 Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

12.5.3.1 Extracción de proteínas intracelulares de *P. pentosaceus* 1101

La biomasa de los tratamientos (100 mg) se sometió a dos lavados consecutivos con tampón PBS frío (pH 7.2) y se maceró con nitrógeno líquido; el polvo resultante se resuspendió en 1 mL de solución del reactivo TRIS (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, EE.UU.). Los extractos de proteínas se homogeneizaron y se clarificaron aún más mediante centrifugación a 4 °C durante 15 minutos a $12.096 \times g$. Las proteínas se precipitaron con un volumen de 1.5 mL de isopropanol (100%), el precipitado final se lavó dos veces con acetona (100%) seguido de un lavado con una solución de acetona al 80%, y el pellet de proteínas se resuspendió en tampón (50 mM Tris-HCl, 5 mM DTT, 6 M Urea, pH 7.4) y se liofilizó.

12.5.3.2 Análisis LC-MS/MS

Antes de la LC-MS/MS, los extractos de proteínas se volvieron a solubilizar en 10 μ l de un tampón Tris-HCl 50 mM de pH 8 con 6 M de urea. Las proteínas se redujeron con 45 mM de DTT y 100 mM de bicarbonato de amonio durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente, se añadió yodoacetamida para la alquilación de las proteínas (100 mM de yodoacetamida, 100 mM de bicarbonato de amonio durante 20 minutos a 24 °C en la oscuridad). Las proteínas se digirieron con una solución de tripsina (5 ng/ μ L de tripsina de grado de secuenciación de Promega, 50 mM de bicarbonato de amonio). La digestión de las proteínas se realizó a 37 °C durante 18 h. Los digeridos de proteínas se desalaron utilizando MCX (Waters Oasis MCX 96-well Elution Plate). Los péptidos se cargaron en una columna Self-Pack C18 de 75 μ m de diámetro interior \times 150 mm instalada en el sistema Easy-nLC II (de Proxeon Biosystems, ahora Thermo Scientific). Los disolventes utilizados para la cromatografía fueron ácido fórmico al 0.2% (disolvente A) y acetonitrilo al 90%/0.2% de ácido fórmico (disolvente B); el disolvente B aumentó primero del 1 al 37% en 85 min y luego del 40 al 85% de B en 15 min. Los péptidos se eluyeron con un gradiente de dos pendientes a un flujo de 250 nL/min. El sistema HPLC se acopló a un espectrómetro de masas Orbitrap Fusion (Thermo Scientific) mediante una fuente de iones Nanospray Flex. En el Orbitrap se adquirieron espectros de sondeo MS de barrido completo (m/z 360-1560) en modo de perfil con una resolución de 120.000 y un valor objetivo de 3e5. Los iones péptidos se fragmentaron en la célula de colisión HCD y se analizaron en la trampa de iones lineal con un valor objetivo de 2e4 y una energía de colisión normalizada de 28.

12.5.3.3 Búsqueda en bases de datos y criterios de identificación de proteínas

Todas las muestras de MS/MS se analizaron con Mascot (Matrix Science, Londres, Reino Unido; versión 2.6.2). Mascot se configuró para buscar en la base de datos UniProt_Pediococcus_Pentosaceus_strain_ATCC_25745. Mascot se buscó con una tolerancia de masa de iones de fragmentos de 0.60 Da y una tolerancia de iones padre de 10.0 PPM. Se utilizó Scaffold (versión Scaffold_5.1.2, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en MS/MS. Las identificaciones de péptidos se aceptaron si podían establecerse con una probabilidad superior al 90.0% mediante

el algoritmo Peptide Prophet [Keller *et al.*, 2002]. Las identificaciones de proteínas se aceptaron si podían establecerse con una probabilidad superior al 90.0% y contenían al menos un péptido identificado [Nesvizhskii *et al.*, 2003]. Se estableció una tasa de falsos descubrimientos (FDR) de <1.0%, basada en una base de datos señuelo.

12.5.3.4 Análisis bioinformático

Los espectros totales se utilizaron para la cuantificación de proteínas label-free [Zhu *et al.*, 2009]. El análisis de enriquecimiento de la ontología genética (GO) se realizó con DAVID [Sherman *et al.*, 2022] y se visualizó con R studio (version 2022.7.1.554, MA, EUA).

12.6 Análisis estadístico

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como la media \pm la desviación estándar. Las diferencias significativas se calcularon mediante comparaciones múltiples de la prueba de Duncan o la prueba t de dos muestras ($p < 0.05$), se aseguró que los datos obtenidos cumplen el supuesto de homogeneidad de varianzas. El análisis estadístico se realizó con el programa NCSS, 2007 (versión 1).

En la **figura 3** se esquematiza a modo de resumen gráfico, la metodología anteriormente descrita para mayor comprensión del lector en el seguimiento de los experimentos realizados en este estudio.

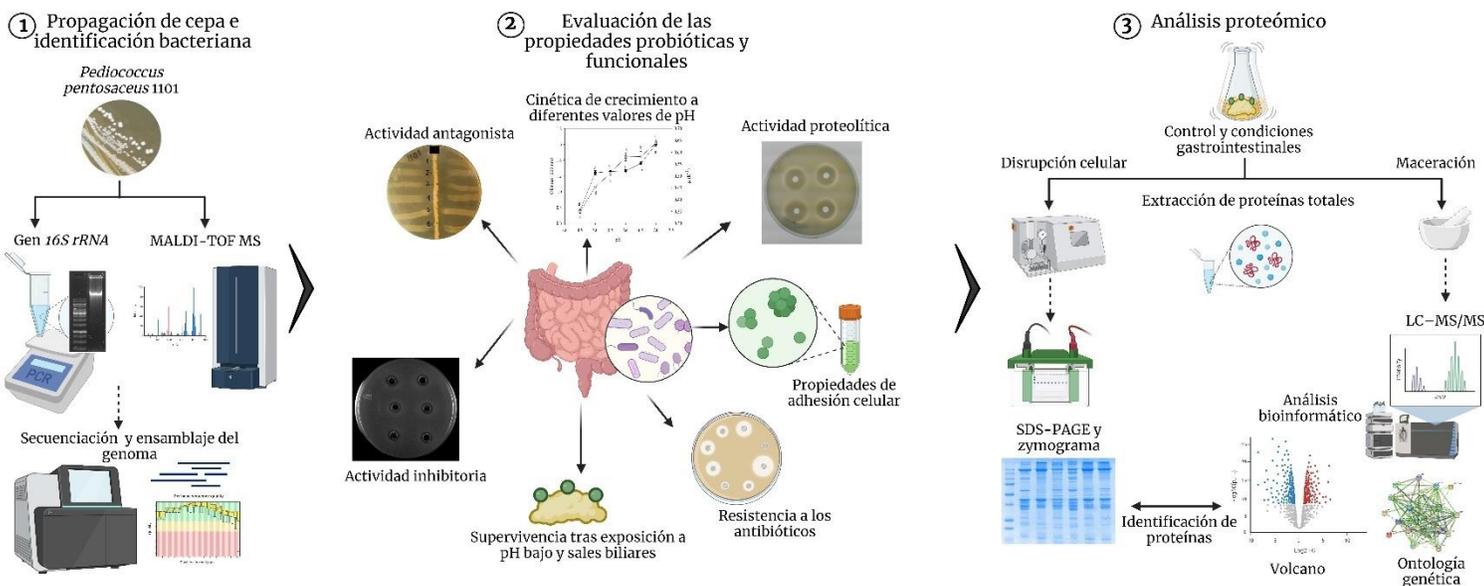


Figura 3. Resumen gráfico.

13 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

13.1 Identificación de la cepa

Observamos la integridad del ADN extraído de la cepa 1101 en el gel de electroforesis de agarosa, así como el producto de la amplificación del gen *16S rRNA* (Fig. 4). La identidad de la cepa *P. pentosaceus* 1101 se identificó utilizando dos técnicas diferentes. Se obtuvo una similitud de secuencia BLAST con un 99% de identidad y una cobertura del 100% con el gen *ARNr 16S* de *P. pentosaceus* DSM20336 utilizando la secuencia parcial con número de acceso NR_042058. La identidad de la cepa se corroboró mediante el sistema MALDI Biotyper con una identificación de alta confianza (2.27) y consistencia, y la secuencia de *ARNr 16S* obtenida se depositó en el GenBank (NCBI) con el número de acceso *P. pentosaceus* 1101: MZ265376.

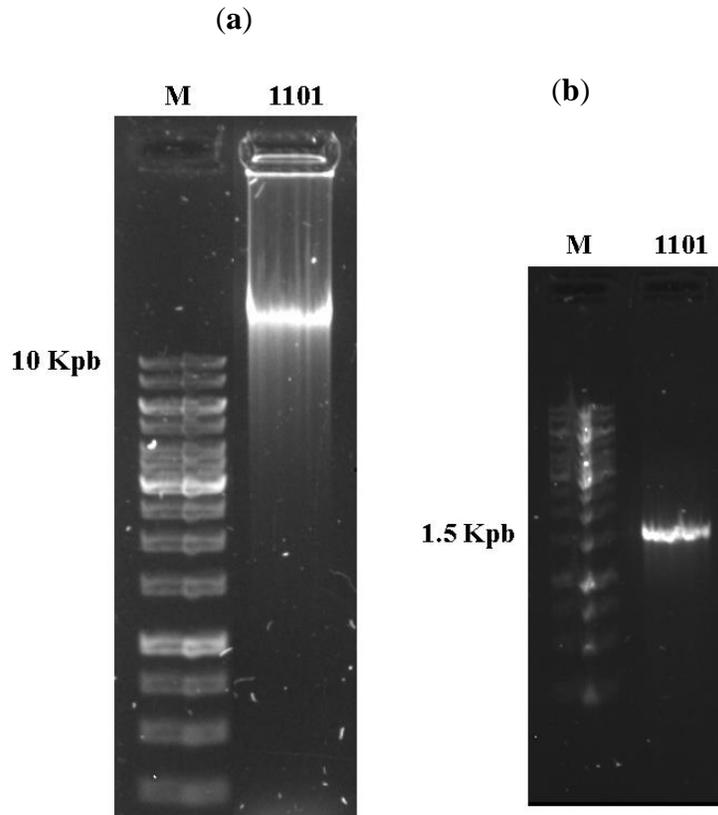


Figura 4. (a): Gel de electroforesis al 0.8% de agarosa, se muestra la banda que corresponde al material genético de la cepa 1101; (b): gel de agarosa al 1%, se muestra la banda que corresponde al producto de PCR del gen *ARNr 16S* de la cepa 1101. M, Marcador de pesos moleculares de ADN Ladder.

13.2 Ensamble del genoma

El ensamblaje final del genoma comprometió 7 contigs y un contenido global de GC del 37.05%, obteniendo un valor N50 de 293,806 y un tamaño del genoma de 1.76 Mbp. El genoma de *P. pentosaceus* 1101 fue anotado utilizando el pipeline Prokka, que identificó 1,754 secuencias codificantes (CDS), 55 rRNAs y 33 tRNAs, de los cuales 576 correspondían a proteínas identificadas a través del análisis proteómico bajo los tratamientos GC y control. El genoma completo de *P. pentosaceus* 1101 fue depositado en el DDBJ/ENA/GeneBank bajo el número de acceso JAOAND000000000, Bioproject PRJNA876950 y Biosample SAMN30676162. Los resultados obtenidos del ensamblaje del genoma son consistentes con los informes que indican que el tamaño del genoma del tipo de cepa es de 1.81 Mbp y un contenido de GC del 38.1% [Zheng *et al.*, 2020].

13.3 Evaluación de las propiedades funcionales y probióticas

13.3.1 Actividad antagónica

La **tabla 1** resume los resultados de la actividad antagónica de la cepa *P. pentosaceus* 1101. Esta cepa mostró actividad contra todos los microorganismos ensayados, tanto Gram-negativos (*E. coli* y *S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium) como Gram-positivos (*L. monocytogenes*, *S. aureus* y *E. faecalis*). Esta actividad antagonista es de especial interés en relación con la capacidad de competir con los microorganismos patógenos y de deterioro y su capacidad de producir efectos antibacterianos *in situ*, aunque esto dependerá de factores como el pH y la temperatura, así como de la presencia de organismos competidores o de efectos aditivos [Helander *et al.*, 1997].

Tabla 1. Actividad antagónica de *P. pentosaceus* 1101 contra diferentes microorganismos de prueba.

Cepa	Actividad antagónica
<i>Escherichia coli</i> DH5 α GenBank:NZ_JRYM00000000.1 ^a	+
<i>Enterococcus faecalis</i> 1351 ^b	+
<i>Listeria monocytogenes</i> 1639 ^b	+
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028 ^a	+
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 ^a	+
<i>Weissella viridescens</i> GenBank: UAM-MG5: MT814884 ^b	+

+: indica reacción positiva por inhibición del crecimiento de la cepa de prueba. Fuente de la cepa: ^a Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, ^b Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana, México.

En la **figura 5** se puede observar la actividad antagónica que presentó la cepa 1101 en la placa contra todas las cepas probadas.

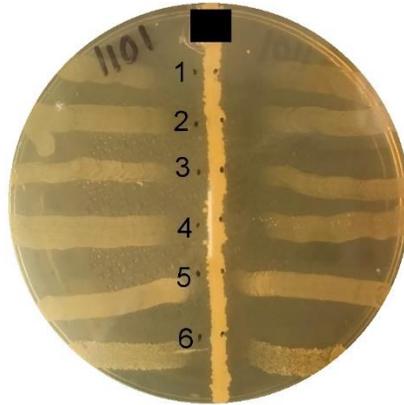
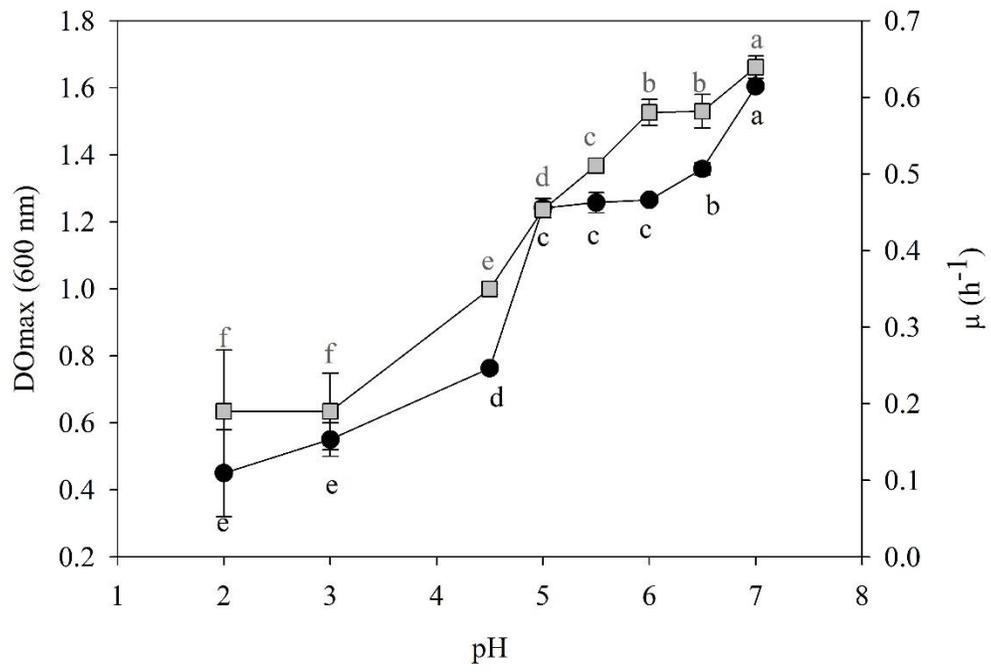


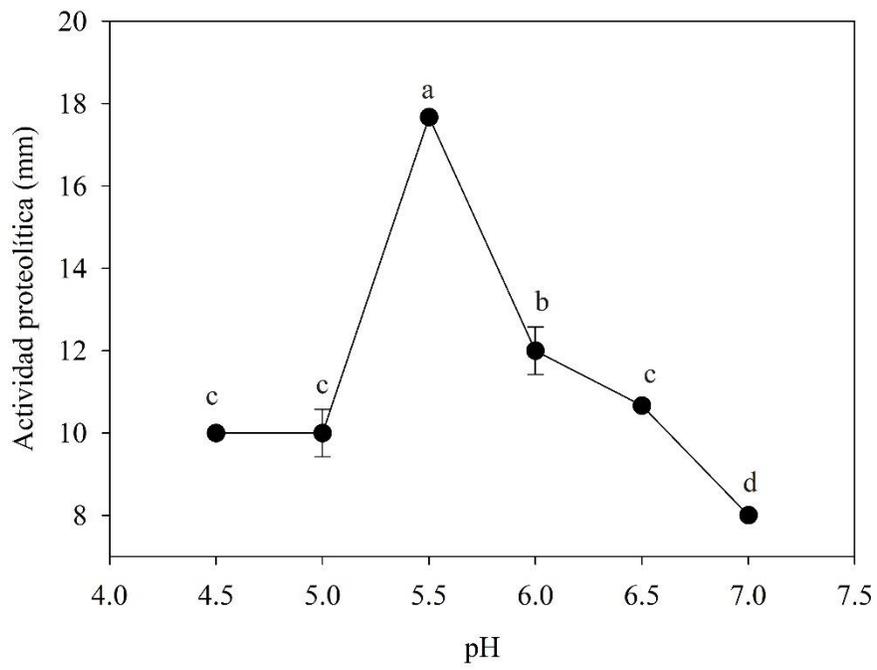
Figura 5. Actividad antagónica de la cepa *P. pentosaceus* 1101: **1**, *Escherichia coli*; **2**, *Enterococcus faecalis*; **3**, *Listeria monocytogenes*; **4**, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium; **5**, *Staphylococcus aureus* y **6**, *Weissella*.

13.3.2 Crecimiento, actividad proteolítica e inhibitoria a diferentes valores de pH

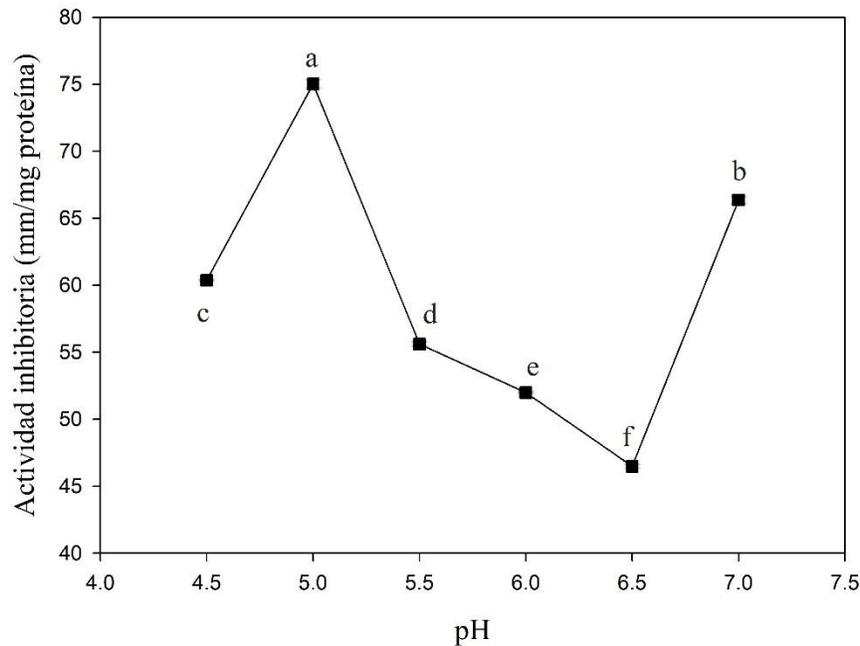
La **figura 6a** muestra el efecto del pH sobre la tasa de crecimiento (μ) y la densidad óptica máxima (ODmax) de *P. pentosaceus* 1101. La influencia del pH en el crecimiento quedó demostrada por el aumento de la tasa de crecimiento a medida que el valor del pH aumentaba de 2 a 7.0 (0.639 ± 0.014). En este trabajo, *P. pentosaceus* 1101 mostró la mayor actividad proteolítica a un pH bajo (5.5) (**Fig. 6b**). La actividad inhibitoria se vio favorecida en condiciones ácidas (pH 4.5-5.0) y la actividad inhibitoria para *L. innocua* fue la segunda mejor a pH 7.0 (**Fig. 6c**). Estos resultados proporcionan la primera aproximación documentada para optimizar las condiciones fisicoquímicas de crecimiento para mejorar la actividad inhibitoria de la cepa 1101.



(a)



(b)



(c)

Figura 6. (a) Influencia del pH (pH 2 y 3 durante 9 h, pH 4.5-7-0 durante 24 h) en el crecimiento de *P. pentosaceus* 1101 (D.O. máx (●), μ (■)). (b) Curva de actividad proteolítica. (c) Actividad inhibitoria con *Listeria innocua*. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la comparación múltiple de medias de Duncan.

P. pentosaceus 1101 crece en un rango de pH de 2-7, este hecho podría estar relacionado con su presencia en carnes fermentadas ya que durante la fermentación y secado de embutidos, un perfil de pH cada vez más ácido (5.68-4.96) estimula la liberación de péptidos derivados de la actina y favorece el crecimiento de las BAL [Berardo *et al.*, 2017]. Se observó una condición similar para la cepa estudiada 1101, que tiene actividad proteolítica a pH 4.5-7, lo que sugiere que *P. pentosaceus* 1101 podría producir enzimas proteolíticas activas en condiciones ácidas y neutras. El pH afecta al transporte de varios factores de crecimiento a través de la membrana celular de la BAL; por lo tanto, si la bacteria no está en su pH óptimo de crecimiento, su actividad proteolítica se verá afectada directa o indirectamente [Sun *et al.*, 2019]. En este estudio, la actividad proteolítica se vio favorecida a un pH ácido de 5.5, y otros estudios demostraron una actividad antilisterial moderada de *P. acidilactici* a pH 3.5 y 8.5, a una temperatura de 30 °C [Engelhardt *et al.*,

2015]. La actividad antagonista exhibida por *P. pentosaceus* 1101 en este estudio puede estar relacionada con el ambiente ácido causado por la producción de ácidos orgánicos que inhiben el desarrollo de microorganismos alterantes a valores bajos de pH [Juárez-Castelán, 2019]. Sin embargo, varios estudios han informado de que *P. pentosaceus* produce compuestos antimicrobianos, como péptidos, bacteriocinas y PGH, por lo que la actividad antimicrobiana puede deberse al efecto combinado de estos metabolitos [Engelhardt *et al.*, 2015; Montville y Chen, 1998]. La eficacia de estos péptidos antimicrobianos puede depender de varios factores, como el pH, la presencia de enzimas proteolíticas endógenas, el potencial de membrana y la composición lipídica, que en última instancia inducen cambios en la actividad antimicrobiana y su especificidad. Por ejemplo, las bacteriocinas son estables en una amplia gama de pH, con una elevada actividad a pH neutro y básico, pero son inactivadas por las proteasas endógenas [Montville y Chen, 1998]. Así, la mayor actividad antimicrobiana observada a pH 5,5 y 7 para *P. pentosaceus* 1101 coincide con una disminución de la actividad proteolítica.

13.3.3 Supervivencia de *P. pentosaceus* 1101 tras la exposición a un pH bajo y a la bilis

La supervivencia en las condiciones del tracto gastrointestinal de bajo pH y sales biliares son criterios de selección esenciales para que las cepas microbianas sean consideradas probióticas [Havenaar *et al.*, 1992]. Antes de llegar a la parte distal del tracto gastrointestinal y ejercer sus efectos probióticos, estas bacterias deben sobrevivir durante la transición del estómago a la parte superior del tracto gastrointestinal. Los valores de pH en el estómago humano oscilan entre 1.5 durante el ayuno y 4.5, y la ingesta de alimentos puede tardar hasta 3 horas [Jacobsen *et al.*, 1999]. Por lo tanto, es necesario evaluar la supervivencia y el crecimiento a un pH bajo de 2.0, 3.0 y 0.5% de sales biliares como evaluaciones preliminares de la tolerancia de *P. pentosaceus* 1101.

El análisis de la resistencia al pH ácido y la tolerancia a las sales biliares al 0.5% son condiciones que afectan a la supervivencia bacteriana durante el paso por el tracto gastrointestinal, tal y como reporto Martoni utilizando un modelo *in vitro* [Martoni *et al.*, 2007]. La cepa 1101 sobrevivió a la exposición durante 1 hora a pH 2.0 y pH 3.0 y toleró

las condiciones de 0.5% de sales biliares durante 1 h. A pH 2.0 (**Fig. 7**), se produjo una disminución de 1.201 \log_{10} UFC/mL, tanto a pH 3.0 como en el medio suplementado con 0.5% de sales biliares, mostró una disminución mucho menor a una unidad logarítmica, partiendo de un recuento inicial de 9.0 \log_{10} UFC/mL. Los datos muestran que la tasa logarítmica de supervivencia ácida media de *P. pentosaceus* 1101 a pH 2.0 fue del 86.8% y del 93.9% a pH 3.0 en el medio sin sales biliares. Sin embargo, cuando el medio contenía 0.5% de sales biliares, la supervivencia fue del 99.1% (**Tabla 2**).

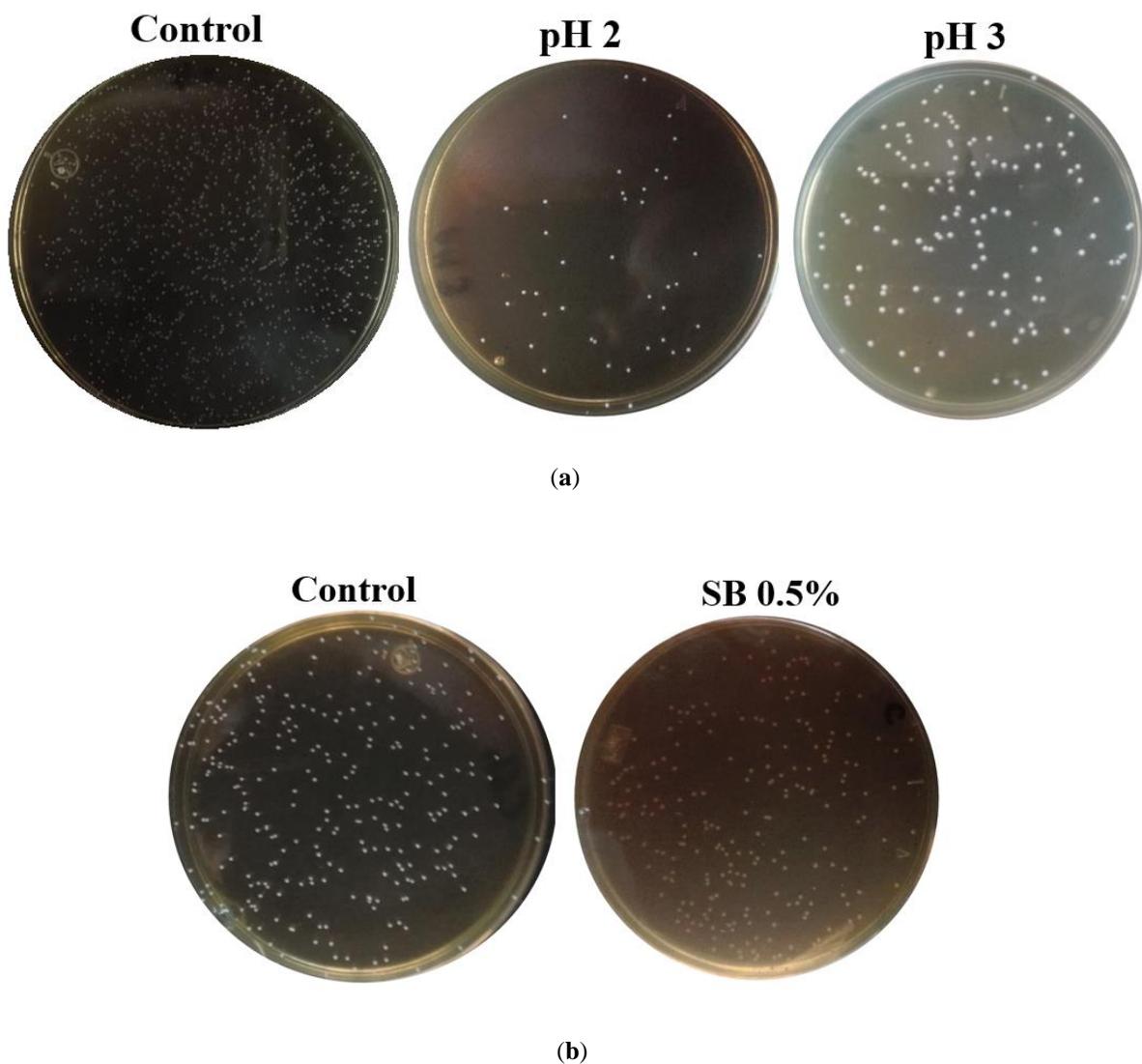


Figura 7. Recuento en placa para determinar la viabilidad celular de *P. pentosaceus* 1101, (a): Control, pH 2.0 y 3.0; (b):Control y 0.5% de sales biliares.

Tabla 2. Evaluación de la tolerancia a la acidez y las sales biliares: tasa de supervivencia tras la exposición a sales biliares, pH 2 y 3 durante 1 h.

Condición	D.O. max	μ (h ⁻¹)	Recuento inicial log ₁₀ UFC/mL	Recuento final log ₁₀ UFC/mL	Tasa logarítmica de supervivencia (%)
<i>Resistencia a sales biliares</i>					
Control	1.30 ± 0.01	0.69 ± 0.01 ^b			
0.5%	1.28 ± 0.01	1.08 ± 0.01 ^a	9.448 ± 0.005	9.352 ± 0.002	99.1
<i>Resistencia a la acidez</i>					
Control	1.26 ± 0.01 ^a	0.72 ± 0.01 ^a			
pH 2	0.45 ± 0.13 ^b	0.19 ± 0.08 ^b	9.115 ± 0.012	7.914 ± 0.003	86.8 ^b
pH 3	0.55 ± 0.05 ^b	0.19 ± 0.05 ^b	9.115 ± 0.012	8.556 ± 0.024	93.9 ^a

Los valores representados corresponden a las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Se realizó el análisis de comparación de medias mediante la prueba t de Student de dos muestras, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0.05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de una misma columna.

La cepa 1101 mostró tolerancia a la acidez y a las sales biliares, y su resistencia a las sales biliares se relaciona con la actividad de la hidrolasa de sales biliares (HSB), que puede hidrolizar la sal biliar combinada y reducir así su toxicidad y efectos secundarios [Noriega *et al.*, 2004]. La HSB está codificada por todos los lactobacilos intestinales secuenciados y facilita la adaptación al intestino humano [Ventura *et al.*, 2012]. Además, la cepa *P. pentosaceus* 1101 mostró resistencia a la acidez después de la incubación a pH 2 y 3 durante 3 h, de forma similar a lo informado para las cepas probióticas comerciales *Lactobacillus acidophilus* LA-1 y *L. rhamnosus* GG, que se utilizaron como referencias para la estimación de la tolerancia al tránsito gastrointestinal [Conway *et al.*, 1987; Jaya *et al.*, 1998]. Los resultados de la tasa de supervivencia logarítmica en acidez y sales biliares que se obtuvieron en este estudio son comparables con otros documentados previamente para la cepa de referencia *L. acidophilus* NCFM®, con un 81% de tasa de supervivencia logarítmica reportada a pH 2 y 89.2% en 0.5% de sales biliares [Ruíz-Ramírez *et al.*, 2022]. Además, otros informes con las cepas *L. acidophilus* ADH [Conway *et al.*, 1987] y *Bifidobacterium* [Noriega *et al.*, 2004] también resisten a condiciones gastrointestinales con una disminución de 1 log₁₀ UFC / mL, al igual que los datos obtenidos para *P. pentosaceus* 1101 en condiciones similares.

13.3.4 Resistencia a antibióticos

La resistencia a los antibióticos evaluada con *P. pentosaceus* 1101 se muestra en la **tabla 3**. La cepa estudiada fue sensible a la amoxicilina, el ácido clavulánico, la penicilina, la cefazolina, la cefuroxima y el cloranfenicol; pero la cepa se muestra resistente a la cefalexina, la piperacilina, la azitromicina, la eritromicina, la tetraciclina, la ciprofloxacina, la ofloxacina y el cotrimoxazol. Se ha notificado resistencia a la eritromicina y a la tetraciclina, especialmente en las BAL [Colombo *et al.*, 2020]. Cabe destacar que, a pesar de la posible resistencia de *P. pentosaceus* 1101 a la mayoría de los antibióticos ensayados, fue sensible a antibióticos clínicamente importantes, como la penicilina, la amoxicilina y el cloranfenicol, lo que permitiría considerarlo relativamente "seguro". Estos resultados son coherentes con los comunicados por Savedbowoen, 2014, que descubrió que la mayoría de las cepas de *P. pentosaceus* probadas eran sensibles a la penicilina, el cloranfenicol y la eritromicina, y los comunicados para una cepa de *P. pentosaceus* con potencial como probiótico vaginal [Borges *et al.*, 2013]. Los conocimientos actuales sobre la resistencia a los antibióticos en las BAL siguen siendo limitados, y la controversia sobre la seguridad del uso de posibles cepas probióticas con cierta resistencia a los antibióticos ha sido ampliamente debatida, y algunos autores sostienen que las bacterias probióticas que poseen perfiles de resistencia a los antibióticos podrían ser una ventaja en las aplicaciones clínicas al facilitar su administración conjunta con el tratamiento antibiótico [Cebeci y Gürakan, 2003]. Además, los aislados microbianos destinados a ser utilizados como probióticos deberían mostrar cierta resistencia a los antibióticos, para sobrevivir en el tracto gastrointestinal del huésped y ejercer actividades beneficiosas sobre él [Ślizewska *et al.*, 2021]. Sin embargo, se ha demostrado que las cepas probióticas pueden reducir el número de genes de resistencia a los antibióticos en individuos tolerantes a la colonización y a los antibióticos, lo que puede variar en función de la edad, los hábitos alimentarios y las condiciones de salud [Montassier *et al.*, 2021; Sharma *et al.*, 2021]. Tras un tratamiento con antibióticos, estas cepas probióticas pueden exacerbar la expansión del resistoma mediada por los antibióticos en el tracto gastrointestinal, pero no contribuyen al aumento de los genes de resistencia a los antibióticos de su propio repertorio mediante la transferencia horizontal a comensales y patógenos. La cepa estudiada muestra resistencia a los antibióticos más comunes y hay una posibilidad muy baja de

transferencia de estos genes por conjugación [Montassier *et al.*, 2021], en este estudio no identificamos ningún gen de resistencia a la vancomicina en *P. pentosaceus* 1101.

Tabla 3. Perfil de Resistencia a los antibióticos.

Antibiótico	Perfil de resistencia
<i>Inhibidores de la biosíntesis de la pared celular</i>	
Amoxicilina/ácido clavulánico	S
Amoxicilina	S
Penicilina	S
Cefalexina	R
Cefazolina	S
Cefuroxima	S
Piperacilina	R
<i>Inhibidores de la síntesis de proteínas</i>	
Azitromicina	R
Eritromicina	R
Cloranfenicol	S
Tetraciclina	R
<i>Inhibidores de la síntesis de ADN</i>	
Ciprofloxacina	R
Ofloxacina	R
<i>Inhibidor de productos metabólicos</i>	
Cotrimoxazol	R

S, sensible (≥ 21 mm); R, resistente al antibiótico probado (≤ 15 mm) [Savetboworn *et al.*, 2014].

13.3.5 Propiedades de adhesión celular

En el presente estudio, se evaluó la afinidad por los disolventes orgánicos hexano y cloroformo para determinar las propiedades de la superficie celular. La afinidad por el hexano (disolvente no polar) demuestra la superficie hidrofóbica característica de la bacteria, y la afinidad por el cloroformo (disolvente ácido polar) describe la propiedad de donante de electrones de la superficie celular bacteriana, que se atribuye a los grupos carboxílicos y a las interacciones ácido-base de Lewis [Xu *et al.*, 2009]. La cepa estudiada mostró (**Tabla 4**) una hidrofobicidad significativamente mayor ($91.5 + 0.3$ %) que el control *L. acidophilus* NCFM® ($51.82 + 0.3$ %); ambas cepas tienen afinidad por el cloroformo, siendo *L. acidophilus* NCFM® la que tiene una afinidad significativamente mayor ($94.06 + 0.5$ %), lo que indica su capacidad donadora de electrones. Estos resultados muestran que *P.*

pentosaceus 1101 tiene un perfil de adherencia a superficies hidrofóbicas. Algunos informes han sugerido que las células bacterianas con alta hidrofobicidad tienden a formar fuertes interacciones con las células de la mucosa o se adhieren fuertemente a las células epiteliales [Hernández-Alcántara *et al.*, 2018; Śliżewska *et al.*, 2021].

Tabla 4. Hidrofobicidad bacteriana (%) de bacterias ácido lácticas.

BAL	Solvente	
	Hexano (%)	Cloroformo (%)
<i>P. pentosaceus</i> 1101	91.5 ± 0.3 ^a	19.6 ± 0.4 ^b
<i>L. acidophilus</i> NCFM®	51.8 ± 0.3 ^b	94.1 ± 0.5 ^a

Los valores presentados corresponden a las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de comparación de medias mediante la prueba t de dos muestras, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de una misma columna.

La capacidad de auto-agregación de la cepa estudiada alcanzó el 87%, y su co-agregación con el patógeno *L. monocytogenes* 1639 superó el 74% tras 24 h de incubación (**Tablas 5 y 6**). Las propiedades antagónicas de las cepas probióticas también están relacionadas con la formación de co-agregados con los patógenos que dificultan su adhesión al epitelio intestinal y forman un microambiente que ayuda a los probióticos a eliminar los microorganismos patógenos. [Śliżewska *et al.*, 2021].

Tabla 5. Capacidad de auto-agregación (%) de bacterias ácido lácticas.

BAL	2 h	4 h	6 h	20 h	24 h
<i>P. pentosaceus</i> 1101	10.7 ± 0.3 ^b	14.7 ± 0.5 ^b	21.4 ± 0.4 ^b	62.9 ± 0.5 ^b	86.7 ± 0.2 ^b
<i>L. acidophilus</i> NCFM	14.3 ± 0.2 ^a	25.0 ± 0.1 ^a	32.2 ± 0.3 ^a	84.8 ± 0.3 ^a	96.4 ± 0.2 ^a

Los valores presentados corresponden a las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de comparación de medias mediante la prueba t de dos muestras, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de una misma columna.

Tabla 6. Capacidad de co-agregación (%) de bacterias ácido lácticas.

LAB	2 h	4 h	6 h	20 h	24 h
<i>P. pentosaceus</i> 1101	51.2 ± 0.2 ^b	56.0 ± 0.2 ^b	60.1 ± 0.2 ^b	64.4 ± 0.1 ^b	74.3 ± 0.2 ^b
<i>L. acidophilus</i> NCFM	56.3 ± 0.1 ^a	58.7 ± 0.1 ^a	71.9 ± 0.2 ^a	80.1 ± 0.1 ^a	85.2 ± 0.2 ^a

Los valores presentados corresponden a las medias y desviaciones estándar de tres experimentos independientes. Se realizó un análisis de comparación de medias mediante la prueba t de dos muestras, y las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $p < 0,05$. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los valores de una misma columna.

13.4 Análisis proteómico de *P. pentosaceus* 1101 expuesto en condiciones de control y gastrointestinales

13.4.1 Análisis de SDS-PAGE y determinaciones de la actividad antimicrobiana por zimografía

Para establecer la variación en la producción de metabolitos proteicos con actividad antimicrobiana asociada a las condiciones de cultivo gastrointestinal, fue necesario determinar el perfil de proteínas solubles presentes en condiciones normales para *P. pentosaceus* 1101 para compararlo con el perfil proteico obtenido en condiciones gastrointestinales.

La **figura 8a** muestra el perfil proteico obtenido de la fracción de proteínas solubles para el control y el tratamiento. Se ha observado para el género *Pediococcus* spp. que la expresión de las proteínas antimicrobianas es variable según las condiciones de pH [Párraga Solórzano *et al.*, 2021]. Las bandas se detectaron de 10 a 250 kDa, el perfil proteico se vio afectado por los cambios de pH y la presencia de sales biliares, ya que algunas bandas desaparecieron de 10-25 kDa y otras disminuyeron su intensidad de 75-250 kDa en comparación con el control. En el tratamiento en condiciones gastrointestinales se detectó una banda con actividad lítica de la fracción intracelular contra el microorganismo *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698, con un peso molecular de 29 KDa (**Fig. 8b**).

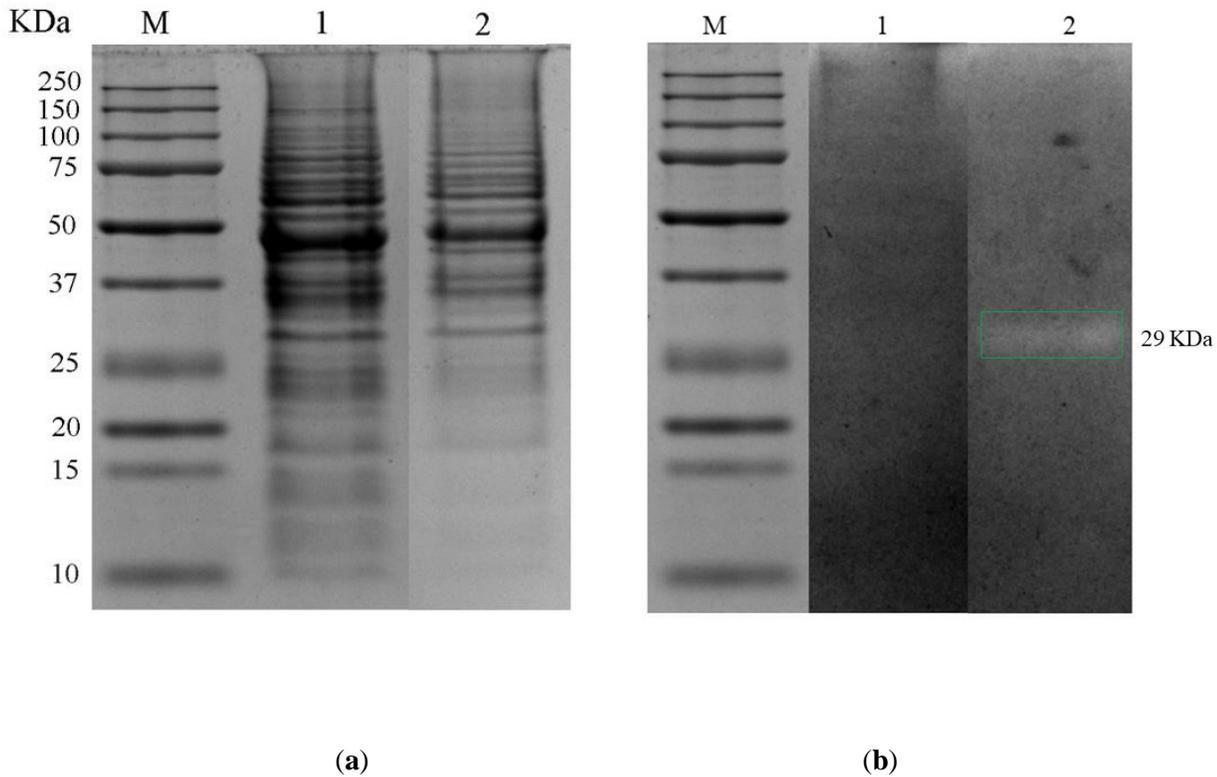


Figura 8. (a) SDS-PAGE 12% y (b) zimograma de la fracción soluble de proteínas intracelulares obtenida con los diferentes tratamientos. Marcador de peso molecular M Bio-Rad Dual Xtra; carril 1-tratamiento de control; carril 2-tratamiento de condiciones gastrointestinales.

13.4.2 Identificación de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Se identificaron un total de 576 proteínas, una comparación entre las proteínas identificadas en los grupos de tratamiento de control y de condiciones gastrointestinales a través del análisis proteómico reveló 493 proteínas expresadas en ambos grupos, 63 proteínas expresadas sólo en el grupo de tratamiento de control y 20 sólo en el grupo de tratamiento de condiciones gastrointestinales (**Fig.9a**). Basándose en la homología de la secuencia, las proteínas se clasificaron en grupos funcionales. Un gráfico de barras circular muestra los 10 grupos funcionales más importantes en cada una de las 3 categorías de la clasificación de la ontología genética (**Fig.9b**), a saber, proceso biológico, componente celular y función molecular que representa la asignación. En total, el 19% de las proteínas identificadas se asociaron con el proceso biológico de la traducción, seguido del 4% para el proceso metabólico de los carbohidratos. Además, el 46% de las proteínas estaban asociadas al

componente celular del citoplasma, y el 16% al componente integral de la membrana y el ribosoma. En cuanto a la función molecular, la mayoría de las proteínas estaban asociadas a la unión de ATP y a la unión de iones.

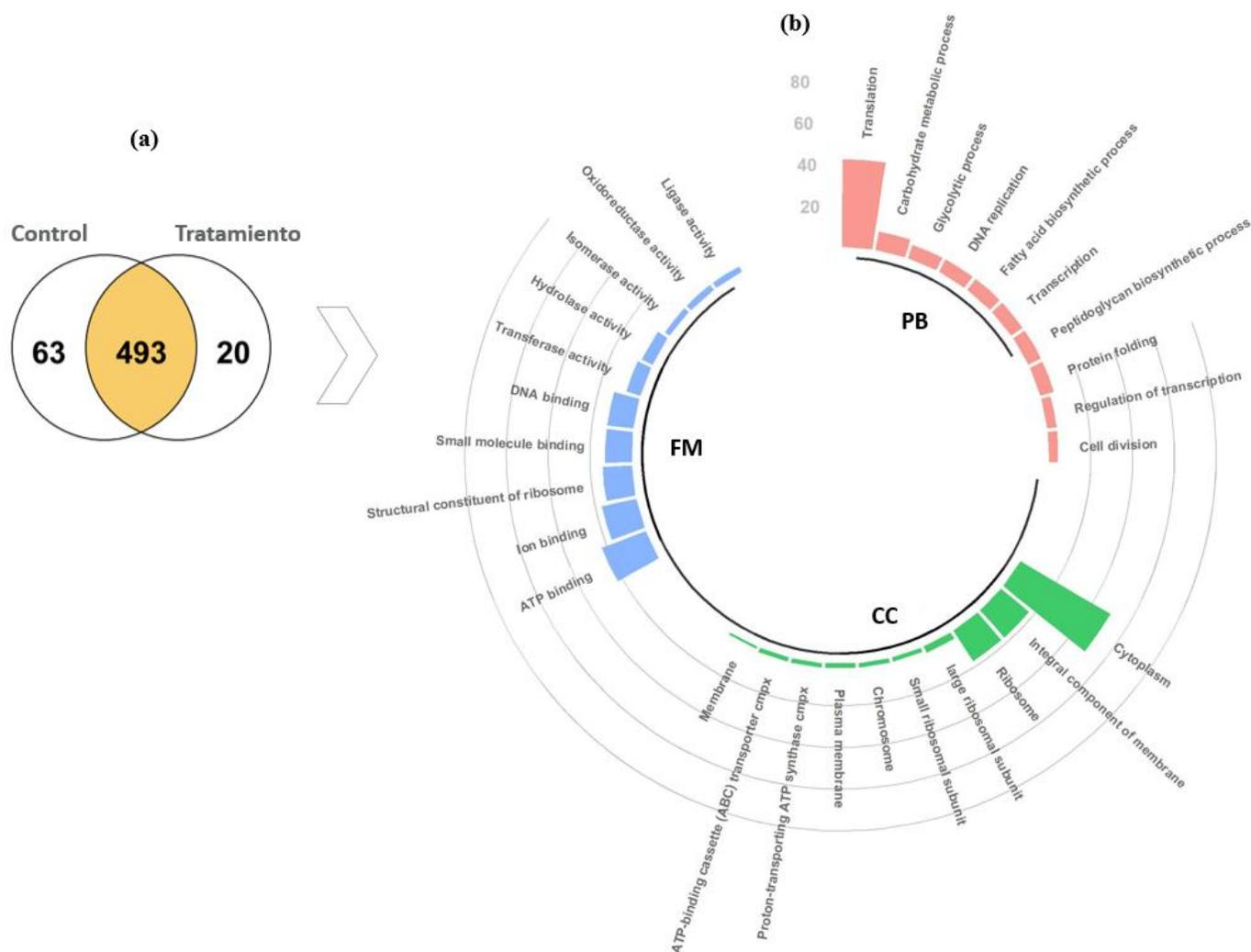


Figura 9. (a) Diagrama de Venn y (b) gráfico de barras circular: clasificación de la ontología genética para las proteínas expresadas en ambos grupos; los resultados se resumen en tres categorías principales: proceso biológico (PB), componente celular (CC) y función molecular (FM).

Varios estudios informan sobre la adaptación de las BAL a diferentes estreses ambientales que podrían deberse a cambios subyacentes en la transcripción de genes y la expresión de proteínas. [Jaya *et al.*, 1998]. El mecanismo de adaptación de las BAL en condiciones de estrés implica la regulación al alza de diferentes proteínas que responden al estrés

[Hernández-Alcántara *et al.*, 2018]. El análisis cuantitativo utilizando una prueba *t*-test entre el tratamiento de las condiciones gastrointestinales y el grupo de control arrojó 100 proteínas que mostraron una abundancia diferencial significativa, 73 de estas proteínas fueron reguladas a la baja y 27 al alza (**Fig. 10**); estos resultados sugieren que la exposición a sales biliares al 0.5% y la acidez en el tratamiento influyen en los perfiles proteicos de *P. pentosaceus* 1101.

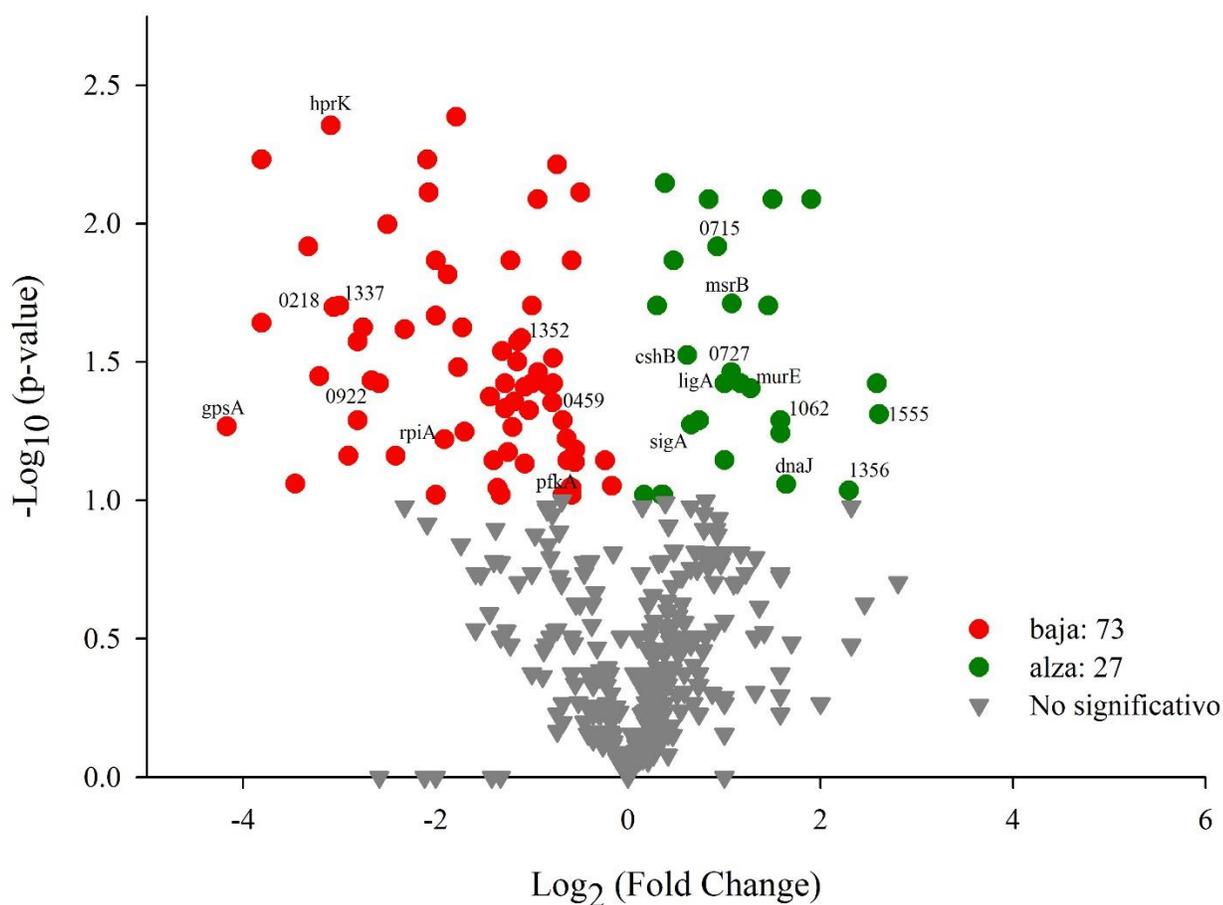


Figura 10. Gráfico de volcano: nivel de cambio de las proteínas de tratamiento y de control. Punto rojo: regulado a la baja; punto verde: regulado al alza; punto gris: no significativo. (*t*-test $p < 0.1$).

La **tabla 7** muestra el impacto de la exposición a sales biliares al 0.5% y a la acidez en el perfil proteómico, resumiendo las 18 principales proteínas reguladas al alza y las encontradas sólo en el grupo de tratamiento de las condiciones gastrointestinales implicadas en los

procesos de tolerancia a las condiciones gastrointestinales, pertenecientes a las categorías funcionales: sistema regulador de dos componentes, proceso catabólico y biosintético del peptidoglicano, proteólisis, reparación del ADN, respuesta al estrés, adhesión celular y unión a la penicilina.

Tabla 7. Lista de las 18 principales proteínas implicadas en los procesos de tolerancia a las condiciones gastrointestinales en *P. pentosaceus* 1101.

Proteína	Gen	Peso molecular (kDa)	Función
Transducción de señales de la histidina-proteína quinasa ArlSArIS ^a	0715	57	Sistema de regulación de dos componentes
Proteína serina/treonina quinasa ^b	0832	57	Fosforilación
<i>N</i> -acetilmuramoil- <i>L</i> -alanina amidasa ^b	1117	32	Proceso catabólico del peptidoglicano
Peptidoglicano transpeptidasa, ErfK-YbiS-YhnG family ^a	1555	51	Proceso de biosíntesis del peptidoglicano
UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil- <i>L</i> -alanil- <i>D</i> -glutamato- <i>L</i> -lisina ligasa ^a	<i>murE</i>	56	
Proteína que contiene el dominio LysM	1356	23	Actividad hidrolasa
Proteasa periplásmica ^a	1062	52	Proteólisis
Componente ATPasa del transportador ABC con dominios ATPasa duplicados ^b	1071	72	Unión de ATP
Factor sigma de la ARN polimerasa SigA ^a	<i>sigA</i>	43	Unión al ADN
ADN ligasa ^a	<i>ligA</i>	75	Reparación del ADN
Exonucleasa específica de ADN monocatenario RecJ ^b	1130	87	
Factor de acoplamiento de la transcripción-reparación TRCF ^b	<i>mfd</i>	132	
Proteína chaperona DnaJ ^a	<i>dnaJ</i>	40	Respuesta al estrés
Péptido metionina sulfóxido reductasa MsrB ^a	<i>msrB</i>	17	
Helicasa de ARN dependiente de ATP DEAD-box CshB ^a	<i>cshB</i>	52	
Proteína RadA ^b	<i>radA</i>	50	
Adesina superficial ^b	0086	34	Adhesión celular
Peptidoglicano específico para la elongación celular D,D-transpeptidasa ^a	0727	74	Unión de la penicilina

^a Proteínas reguladas al alza ^b Proteínas presentes sólo en el tratamiento.

Dos de estas proteínas implicadas en los procesos de tolerancia a las condiciones gastrointestinales, la histidina-proteína quinasa de transducción de señales ArlS y la proteína serina/treonina quinasa, están implicadas en la transducción de señales; la señalización a través de proteínas quinasas es conocida evolutivamente [Lokesh *et al.*, 2022]. La proteína quinasa de histidina de transducción de señales ArlS se ha correlacionado con el sistema de transducción de señales de dos componentes (TCS), que es la forma predominante en que las bacterias perciben y responden para adaptarse a los cambios ambientales, y que consiste en una quinasa receptora de histidina (ArlS) y un regulador de respuesta (ArlR) [Párraga Solórzano *et al.*, 2021]; Se ha demostrado que este locus ArlS-ArlR afecta a la expresión de PGH, a la actividad proteolítica y a las propiedades de adhesión celular, por lo que este mismo sistema TCS puede estar implicado tanto en la actividad antimicrobiana como en la fisiología celular [Fournier y Hooper 2000]. La proteína serina/treonina quinasa es un rasgo característico de muchas bacterias Gram-positivas; estas proteínas participan en procesos vitales, como la división celular y la replicación del ADN, e interactúan con las células epiteliales del intestino humano, inducen la respuesta inmunitaria y modulan la resistencia a los antibióticos [Lokesh *et al.*, 2022].

El análisis proteómico también identificó la *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa de PGH (32 kDa); el dominio enzimático de la *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa escinde el enlace amídico entre los residuos de *N*-acetilmuramoil y *L*-aminoácidos de los glicopéptidos de las paredes celulares bacterianas y tiene un dominio de interacción proteica Src Homology 3 (SH3) N-terminal. Su estructura muestra que dos ácidos glutámicos conservados son los principales residuos catalíticos, y el zinc actúa como cofactor [Shida *et al.*, 2001]. En general, las *N*-acetilmuramoil-*L*-alanina amidasas son miembros del sistema bacteriano autolítico y llevan un péptido señal en su *N*-terminal que permite su transporte a través de la membrana citoplasmática, y el módulo catalítico de la amidasa está fusionado a otro módulo funcional en el *N*-terminal o en el *C*-terminal, que es responsable de la unión de alta afinidad de la proteína a la pared celular [Korndörfer *et al.*, 2006]. Se observó la influencia del pH y la presencia de sales biliares en el perfil de PGH en la cepa 1101, ya que la banda identificada como *N*-acetilmuramoil-*L*-alanina amidasa (32 kDa) se detectó por zimografía en un tratamiento con un peso molecular de 29 kDa. La diferencia de pesos moleculares observada entre la banda de la zimografía (29 kDa) y la obtenida a partir del análisis proteómico (32

kDa) puede deberse a la movilidad electroforética diferencial en la PAGE que contiene las células bacterianas (*M. lysodeikticus*), que se lisan y el SDS-PAGE tradicional. Además, los polipéptidos constituyentes presentan actividad de PGH; por lo tanto, la PGH extracelular observada puede ser liberada de las paredes celulares bacterianas [Gandhi *et al.*, 2020]. El perfil de PGH visualizado en este estudio no permitió determinar el número exacto de estas enzimas producidas por *P. pentosaceus* 1101 porque sólo son detectables las enzimas que pueden ser renaturalizadas y que conservan la actividad enzimática [Mora *et al.*, 2003; Govindasamy-Lucey *et al.*, 2000]. Estos resultados sugieren que la actividad antimicrobiana de *Pediococcus* spp. puede deberse a la producción de PGH, ya que se han descrito actividades líticas de alto y bajo peso molecular [García-Cano *et al.*, 2015; Llorente-Bousquets *et al.*, 2008; Jang *et al.*, 2014]. Por último, la presencia de una banda lítica en el tratamiento con acidez y sales biliares obtenida de la fracción de proteínas solubles citosólicas en el zimograma e identificada mediante el análisis proteómico como *N*-acetilmuramoil-*L*-alanina amidasa confirma un papel en el manejo de las defensas en condiciones gastrointestinales.

Los efectos nocivos de la bilis incluyen la acción detergente, el estrés oxidativo, de bajo pH y osmótico [Hamon *et al.*, 2011]. En nuestro tratamiento, identificamos la proteína chaperona DnaJ, que participa activamente en la respuesta al choque hiperosmótico y térmico, impidiendo la agregación de las proteínas desnaturalizadas por el estrés y desagregando las proteínas no plegadas que se unen inicialmente a DnaJ [Álvarez-Ordóñez *et al.*, 2014]. También se ha identificado un componente ATPasa del transportador ABC; se sabe que esta proteína está implicada en la respuesta de las BAL al estrés osmótico. Transporta compuestos no nocivos que permiten la desintoxicación celular, uno de los efectos deletéreos de la bilis [Hamon *et al.*, 2011].

En consecuencia, cuando *P. pentosaceus* 1101 fue expuesta a un tratamiento gastrointestinal, 73 proteínas fueron reguladas a la baja (**Tabla 8**). En general, estos datos muestran que la exposición de la cepa analizada al tratamiento gastrointestinal produce alteraciones globales significativas en el metabolismo de los carbohidratos y en la actividad de los transportadores. Los sistemas de transporte multidroga de tipo ABC son transportadores de fuerza motriz protónica/sodio que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para extruir diversos sustratos, incluidos fármacos y antibióticos, a través de la membrana celular [Rafii y Park, 2008]; *P.*

pentosaceus 1101 presentaba cierta resistencia a los antibióticos, ya que se identificaron proteínas relacionadas con el transporte y la unión a antibióticos, como el sistema de transporte multidroga de tipo ABC (regulado a la baja) y la peptidoglicano D,D-transpeptidasa específica de la elongación celular (unión a penicilina), que estaba regulada al alza; Sin embargo, la desregulación de las dos proteínas implicadas en el transporte de antimicrobianos y antibióticos en el tratamiento indicaría que este tipo de transporte se ve afectado en condiciones de estrés gastrointestinal.

Tabla 8. Lista de las 13 principales proteínas reguladas a la baja y las encontradas sólo en el tratamiento de control.

Proteína	Gen	Peso molecular (kDa)	Función
Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa ^a	<i>gpsA</i>	36	Proceso metabólico de carbohidratos
HPr quinasa/fosforilasa ^a	<i>hprK</i>	35	
Fructosa-bisfosfato aldolasa ^a	<i>1352</i>	31	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa ^a	<i>0459</i>	37	
6-fosfofructocinasa dependiente de ATP ^a	<i>pfkA</i>	34	
Ribosa-5-fosfato isomerasa ^a	<i>rpiA</i>	25	
L-lactato oxidasa ^a	<i>0922</i>	40	Oxidoreductasa
Malato deshidrogenasa (NAD) ^a	<i>0218</i>	33	Proceso metabólico de ácidos carboxílicos
Sistema de transporte multidroga de tipo ABC ^a	<i>1337</i>	64	Actividad transportadora
Transportador del factor de acoplamiento energético proteína de unión-ATP EcfA ^b	<i>1390</i>	31	
Sistema de transporte de péptidos antimicrobianos de tipo ABC ^b	<i>1650</i>	71	Resistencia a los antibióticos
Esterasa predicha de la superfamilia alfa-beta hidrolasa ^b	<i>0212</i>	33	Catabolismo lipídico
Aspartato racemasa ^b	<i>0662</i>	27	Metabolismo de compuestos nitrogenados

^aProteínas reguladas a la baja, ^bProteínas presentes solo en el tratamiento de control.

No identificamos en el análisis proteómico factores asociados a la patogenicidad de la cepa, con las herramientas de búsqueda utilizando palabras clave como "toxina, proteínas de fago, transposasa, sortasa, colagenasa, hialuronidasa S, BspA, PrfA, PlcH, AvrA, Cnf1, VanC1, VanC2, ErmA, ErmB, ErmC, GelE, Mef, Lnu, CylL, Ccf, FsrB" [Abril *et al.*, 2022]. Por lo

que podemos decir que en las condiciones ensayadas *P. pentosaceus* 1101 no expresó genes relacionados con la virulencia.

Observamos que los mecanismos de defensa frente al estrés descritos para la cepa *P. pentosaceus* 1101 se agrupan según su implicación directa en la conservación de la energía celular, la defensa de las macromoléculas y la protección de la envoltura celular [Papadimitriou *et al.*, 2016]. Estas proteínas identificadas en el análisis proteómico implicadas en la respuesta al estrés ácido y sales biliares también están implicadas en la respuesta adaptativa a condiciones de estrés tecnológico; encontramos chaperonas en el análisis proteómico, que también indican la capacidad inherente de termotolerancia de la cepa estudiada, ya que crece a 43 °C (datos no mostrados), lo cual es importante para la producción de productos alimenticios cocinados, y diferentes especies de BAL que han sido aisladas de embutidos cocinados muestran esta capacidad [Pérez-Chabela *et al.*, 2008]. El análisis proteómico fue capaz de identificar una proteasa periplásmica en el tratamiento de estrés, y la actividad proteolítica de la cepa probada se vio favorecida a un pH ácido de 5.5, lo que corrobora la producción de enzimas proteolíticas activas en condiciones ácidas. Muchos microorganismos patógenos y causantes del deterioro de los alimentos son sensibles a una presión osmótica elevada en comparación con las BAL. A menudo se añade NaCl para ayudar a las BAL a iniciar el proceso de fermentación. Este estrés osmótico disminuye la turgencia positiva de las células bacterianas como resultado de la deshidratación; en tales condiciones, las células producen o importan pequeñas moléculas, llamadas osmolitos, para equilibrar la diferencia entre las osmolaridades intracelular y extracelular y permitir la rehidratación a través de canales asociados a la membrana [Papadimitriou *et al.*, 2016]. *P. pentosaceus* 1101 creció a una concentración de NaCl del 1-6% y mostró actividad proteolítica e inhibitoria a estas concentraciones (datos no mostrados); en este estudio identificamos el componente proteico ATPasa del transportador ABC, que como se ha mencionado está implicado en la respuesta al estrés osmótico. Se cree que concentraciones de NaCl de hasta el 7% pueden potenciar la actividad de producción de ácido de las BAL y los compuestos antimicrobianos [Delgado *et al.*, 2005; Engelhardt *et al.*, 2015].

14 CONCLUSIÓN

Se comprobó que varias proteínas pueden tener un factor clave en la adaptación de *Pediosoccus pentosaceus* 1101 en el tracto gastrointestinal; esta cepa aislada de chorizo tipo español, muestra capacidad para sobrevivir a la acidez y a las sales biliares, posee propiedades de adhesión celular y cierta sensibilidad a los antibióticos. La mayoría de las proteínas identificadas están relacionadas con procesos biológicos de traducción, metabolismo de carbohidratos y funciones moleculares de ATP y unión de iones. El mecanismo de adaptación de *P. pentosaceus* 1101 en condiciones de estrés gastrointestinal consistió en la regulación diferencial de proteínas implicadas en los mecanismos por los que la cepa percibe los efectos del ácido y las sales biliares y reacciona a los cambios ambientales (transducción de señales histidina-proteína cinasa ArlS), adhesión celular (proteína cinasa serina/treonina y adhesina de superficie), modulación de la resistencia a los antibióticos (sistema de transporte antimicrobiano multidroga y de tipo ABC), actividad antimicrobiana (*N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa), estrés osmótico (componente ATPasa del transportador ABC), desagregación de proteínas no plegadas (proteína chaperona DnaJ). *P. pentosaceus* 1101 también mostró una importante actividad antagonista, inhibidora y proteolítica, por lo que la cepa podría promover la hidrólisis de las proteínas alimentarias durante el proceso de fermentación o maduración e intervenir en el desarrollo de las características sensoriales de los productos, así como en la estabilidad microbiológica y la seguridad. Basándonos en los resultados del presente estudio, *P. pentosaceus* 1101 podría tener potencial para su uso como probiótico, ya que puede sobrevivir al paso al intestino, o podría utilizarse como cultivo bioprotector en alimentos fermentados debido a su capacidad para competir con microorganismos alterantes y patógenos. Hemos obtenido una serie de resultados que aportan información sobre cómo responden molecularmente los probióticos al estrés durante el tránsito gastrointestinal y que también podrían ser útiles para la selección de cepas que intervienen en el procesado de alimentos.

15 PERSPECTIVAS

La transferencia horizontal de genes de resistencia a los antibióticos entre la población microbiana a través de cepas probióticas es una posibilidad, por tanto, sería importante confirmar la naturaleza intransferible de estos genes en *Pediococcus pentosaceus* 1101.

Podría también confirmarse la capacidad de adherencia que mostró la cepa llevando a cabo estudios con células epiteliales.

Estos podrían ser criterios clave, pensando en desarrollar una formulación probiótica con aplicación en alimentos, sistemas humanos y animales.

16 REFERENCIAS

- Abril, A. G., Quintela-Baluja, M., Villa, T. G., Calo-Mata, P., Barros-Velázquez, J., & Carrera, M. (2022). Proteomic Characterization of Virulence Factors and Related Proteins in *Enterococcus* Strains from Dairy and Fermented Food Products. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10971.
- Aguilar-Zarate, P., Cruz-Hernandez, M. A., Montanez, J. C., Belmares-Cerda, R. E., & Aguilar, C. N. (2014). Enhancement of tannase production by *Lactobacillus plantarum* CIR1: validation in gas-lift bioreactor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 37, 2305-2316.
- Aires, J., & Butel, M. J. (2011). Proteomics, human gut microbiota and probiotics. *Expert Review of Proteomics*, 8(2), 279-288.
- Álvarez-Ordóñez, A., Begley, M., Clifford, T., Deasy, T., Collins, B., & Hill, C. (2014). Transposon mutagenesis reveals genes involved in osmotic stress and drying in *Cronobacter sakazakii*. *Food research international*, 55, 45-54.
- Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D., & Kuipers, O. P. (2016). Bacteriocins of lactic acid bacteria: extending the family. *Applied microbiology and biotechnology*, 100, 2939-2951.
- Andreevskaya, M., Johansson, P., Laine, P., Smolander, O. P., Sonck, M., Rahkila, R., ... & Björkroth, J. (2015). Genome sequence and transcriptome analysis of meat-spoilage-associated lactic acid bacterium *Lactococcus piscium* MKFS47. *Applied and environmental microbiology*, 81(11), 3800-3811.
- Arief, I. I., Jenie, B. S. L., Astawan, M., Fujiyama, K., & Witarto, A. B. (2015). Identification and probiotic characteristics of lactic acid bacteria isolated from Indonesian local beef. *Asian J. Anim. Sci*, 9(1), 25-36.
- Badiger, S. S. (2021). Investigation of interactions between Lactic Acid Bacteria in Consortia, and their impact on Enzymatic and Antimicrobial activities (Doctoral dissertation, The Ohio State University).
- Baig, M. A., Turner, M. S., Liu, S. Q., Al-Nabulsi, A. A., Shah, N. P., & Ayyash, M. M. (2021). Potential Probiotic *Pediococcus pentosaceus* M41 Modulates Its Proteome Differentially for Tolerances Against Heat, Cold, Acid, and Bile Stresses. *Frontiers in Microbiology*, 12, 731410.

- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., ... & Pevzner, P. A. (2012). SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of computational biology*, *19*(5), 455-477.
- Bao, Y., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, Y., Wang, S., Dong, X., ... & Zhang, H. (2010). Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. *Food control*, *21*(5), 695-701.
- Berardo, A., Devreese, B., De Maere, H., Stavropoulou, D. A., Van Royen, G., Leroy, F., & De Smet, S. (2017). Actin proteolysis during ripening of dry fermented sausages at different pH values. *Food chemistry*, *221*, 1322-1332.
- Borges, S., Barbosa, J., Silva, J., & Teixeira, P. (2013). Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. *Journal of Applied Microbiology*, *115*(2), 527-538.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, *72*(1-2), 248-254.
- Buist, G., Steen, A., Kok, J., & Kuipers, O. P. (2008). LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido) glycans. *Molecular microbiology*, *68*(4), 838-847.
- Carvalho, B. F., Sales, G. F. C., Schwan, R. F., & Ávila, C. L. S. (2021). Criteria for lactic acid bacteria screening to enhance silage quality. *Journal of Applied Microbiology*, *130*(2), 341-355.
- Cebeci, A., & Gürakan, C. (2003). Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food microbiology*, *20*(5), 511-518.
- Chen, F., Zhu, L., & Qiu, H. (2017). Isolation and probiotic potential of *Lactobacillus salivarius* and *Pediococcus pentosaceus* in specific pathogen free chickens. *Brazilian Journal of Poultry Science*, *19*, 325-332.
- Collado, M. C., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2008). Adhesion and aggregation properties of probiotic and pathogen strains. *European food research and technology*, *226*, 1065-1073.
- Colombo, M., Nero, L. A., & Todorov, S. D. (2020). Safety profiles of beneficial lactic acid bacteria isolated from dairy systems. *Brazilian Journal of Microbiology*, *51*, 787-795.
- Conway, P. L., Gorbach, S. L., & Goldin, B. R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of dairy science*, *70*(1), 1-12.
- Cotter, P. D., & Hill, C. (2003). Surviving the acid test: responses of gram-positive bacteria to low pH. *Microbiology and molecular biology reviews*, *67*(3), 429-453.
- Csoboz, B., Gombos, I., Kóta, Z., Dukic, B., Klement, É., Varga-Zsíros, V., ... & Török, Z. (2022). The small heat shock protein, HSPB1, interacts with and modulates the physical structure of membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(13), 7317.
- Dabés, A. C., Santos, W. L. M., & Pereira, E. M. (2001). Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas isoladas de produtos cárneos frente a *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *53*, 136-140.
- Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noe-Arroyo, F., & Garrido-Fernández, A. (2005). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. *Food Microbiology*, *22*(6), 521-528.
- Doyle, M. P.; Meng, J. I. A. N. G. H. O. N. G. (2006). Bacteria in food and beverage production. In *The Prokaryotes*, 3rd ed.; Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, Eds.; Springer: New York, USA. Volume 1, pp. 797-811.

- Ehrmann, M. A., Kurzak, P., Bauer, J., & Vogel, R. F. (2002). Characterization of lactobacilli towards their use as probiotic adjuncts in poultry. *Journal of applied microbiology*, 92(5), 966-975.
- Eichelmann, C.G. (2006). Respuesta celular al estrés. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 48, 162-172.
- Engelhardt, T., Albano, H., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, C., & Teixeira, P. (2015). Antilisterial activity of bacteriocinogenic *Pediococcus acidilactici* HA6111-2 and *Lactobacillus plantarum* ESB 202 grown under pH and osmotic stress conditions. *Food microbiology*, 48, 109-115.
- Erkkilä, S., & Petäjä, E. (2000). Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. *Meat science*, 55(3), 297-300.
- Fan, S., Xue, T., Bai, B., Bo, T., & Zhang, J. (2022). Probiotic Properties Including the Antioxidant and Hypoglycemic Ability of Lactic Acid Bacteria from Fermented Grains of Chinese Baijiu. *Foods*, 11(21), 3476.
- Flórez, A. B., Delgado, S., & Mayo, B. (2005). Antimicrobial susceptibility of lactic acid bacteria isolated from a cheese environment. *Canadian journal of microbiology*, 51(1), 51-58.
- Fournier, B., & Hooper, D. C. (2000). A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity of *Staphylococcus aureus*. *Journal of bacteriology*, 182(14), 3955-3964.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *The Journal of applied bacteriology*, 66(5), 365-378.
- Gandhi, D., Chanalia, P., Bansal, P., & Dhanda, S. (2020). Peptidoglycan hydrolases of probiotic *Pediococcus acidilactici* NCDC 252: isolation, physicochemical and in silico characterization. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 2119-2127.
- García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C. E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., ... & Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied microbiology and biotechnology*, 99, 8563-8573.
- García-Cano, I., Serrano-Maldonado, C. E., Olvera-García, M., Delgado-Arciniega, E., Peña-Montes, C., Mendoza-Hernández, G., & Quirasco, M. (2014). Antibacterial activity produced by *Enterococcus* spp. isolated from an artisanal Mexican dairy product, Cotija cheese. *LWT-Food Science and Technology*, 59(1), 26-34.
- Gorjbach, S. L., Nahas, L., & Lerner, P. I. (1967). Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man. *Gastroenterology*, 53(6), 845-55.
- Govindasamy-lucey, S. E. L. V. A. R. A. N. I., Gopal, P. K., Sullivan, P. A., & Pillidge, C. J. (2000). Varying influence of the autolysin, *N*-acetyl muramidase, and the cell envelope proteinase on the rate of autolysis of six commercial *Lactococcus lactis* cheese starter bacteria grown in milk. *Journal of dairy research*, 67(4), 585-596.
- Guillaume, E., Berger, B., Affolter, M., & Kussmann, M. (2009). Label-free quantitative proteomics of two *Bifidobacterium longum* strains. *Journal of proteomics*, 72(5), 771-784.

- Ramírez, L. A. G., Campuzano, O. I. M., & Villadiego, O. S. R. (2005). Evaluación del potencial bactericida de los extractos de bacterias ácido lácticas sobre el crecimiento in vitro de *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Listeria monocytogenes*. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 36.
- 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, 1-11.
- Havenaar, R.; Brink, B.T.; Huis, I.V.; Jos H.J. (1992). Selection of Strains for Probiotic Use. In *Probiotics*. Springer, Dordrecht. 209-224.
- Heilbronner, S., Krismer, B., Brötz-Oesterhelt, H., & Peschel, A. (2021). The microbiome-shaping roles of bacteriocins. *Nature Reviews Microbiology*, 19(11), 726-739.
- Helander, I., von Wright, A., & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 8(5), 146-150.
- Hernández-Alcántara A.M.; Wachter, C.; Llamas, M.G.; López, P.; Pérez-Chabela, M.L. (2018). Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. *LWT-Food Sci. Technol.*, 91, 249-257.
- Hofmann, A. F., & Mysels, K. J. (1992). Bile acid solubility and precipitation in vitro and in vivo: the role of conjugation, pH, and Ca²⁺ ions. *Journal of lipid research*, 33(5), 617-626.
- Holzappel, W. H.; Wood B. J. (2012). The genera of lactic acid bacteria (Vol. 2). Springer Science & Business Media, 3-6.
- Hugas, M., & Monfort, J. M. (1997). Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food chemistry*, 59(4), 547-554.
- Jacobsen, C.N.; Rosenfeldt, N.V.; Hayford, A.E.; Møller, P.L.; Michaelsen, K.F.; Paerregaard, A.; Sandström, B.; Tvede, M.; Jakobsen, M. (1999). Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of colonization ability of five selected strains in human. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4949-4956.
- Jang, S.; Lee, J.; Jung, U.; Choi, H.S.; Suh, H.J. (2014). Identification of an anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable. *Food control*, 43, 42-48.
- Jaya, P.; Gill, H.; Smart, J.; Gopal, P.K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.*, 8, 993-1002.
- Juárez-Castelán, C. (2019). Evaluación de la diversidad y dinámica bacteriana del chorizo tipo español durante su proceso de maduración, mediante DGGE y secuenciación masiva. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Juárez-Castelán, C.; García-Cano, I.; Escobar-Zepeda, A.; Azaola-Espinosa, A.; Álvarez-Cisneros, Y.; Ponce-Alquicira, E. (2019). Evaluation of the bacterial diversity of Spanish-type chorizo during the ripening process using high-throughput sequencing and physicochemical characterization. *Meat. Sci.*, 150, 7-13.
- Keller, A.; Nesvizhskii, A. I.; Kolker, E.; and Aebersold R. (2002). Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. *Anal. Chem.*, 74 (20), pp 5383-5392 DOI: 10.1021/ac025747h
- Khan, I.; Kang, S.C. (2016). Probiotic potential of nutritionally improved *Lactobacillus plantarum* DGK-17 isolated from Kimchi—A traditional Korean fermented food. *Food Control*, 60, 88-94.

- Klaenhammer, T.R. (1993). "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria" *FEMS Microbiol. Rev.*, 12:39–85.
- Korndörfer, I. P.; Danzer, J.; Schmelcher, M.; Zimmer, M.; Skerra, A.; and Loessner, M. J. (2006). The crystal structure of the bacteriophage PSA endolysin reveals a unique fold responsible for specific recognition of *Listeria* cell walls. *J. Mol. Biol.*, 364(4), 678–689.
- Kosin, B.; Rakshit, S.K. (2010). Induction of heat tolerance in autochthonous and allochthonous thermotolerant probiotics for application to white shrimp feed. *Aquac.*, 306, 302–309.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, 227, 680–685.
- Li, H. ; Xie, X. ; Li, Y. ; Chen, M. ; Xue, L. ; Wang, J., ... & Wu, Q. (2021). *Pediococcus pentosaceus* IM96 Exerts Protective Effects against Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 Infection In Vivo. *Foods*, 10(12), 2945.
- Llorente-Bousquets, A.; Pérez-Munguía, S.; Farrés, A. (2008). Novel extracellular proteolytic activity in *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Can. J. Microbiol.*, 54, 694–699.
- Lokesh, D.; Psn, S.; and Kammara, R. (2022). PeSTK db a comprehensive data repository of Probiotic Serine Threonine kinases. *Scientific Data*, 9(1), 1–6.
- Lopez-Arvizu, A.; García-Cano, I.; Perez-Chabela M.L.; Ponce-Alquicira E. (2019). Antimicrobial bacteriocins and peptidoglycan hydrolases: beneficial metabolites produced by lactic acid bacteria. Capítulo 7 en: The many benefits of lactic acid bacteria. LeBlanc, J.G. y A. Moreno LeBlanc Eds. Nova Science Pub. New York. 125–162.
- López-Cuellar, M.R.; Rodríguez-Hernández A.I.; Chavarría-Hernandez N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 30(6): 1039–1050.
- Malik, A.; Sakamoto, M.; Hanazaki, S.; Osawa, M.; Suzuki, T.; Tochigi, M.; Kakii, K. (2003). Coaggregation among Nonflocculating Bacteria Isolated from Activated Sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 6056–6063.
- Martoni, C.; Bhathena, J.; Jones, M.L.; Urbanska, A.M.; Chen, H.; Prakash, S. (2007). Investigation of microencapsulated BSH active *Lactobacillus* in the simulated human GI tract. *J. Biomed. Biotechnol.*, 13684.
- Mbye, M.; Baig, M. A.; AbuQamar, S. F.; El-Tarabily, K. A.; Obaid, R. S.; Osaili, T. M., ... & Ayyash, M. M. (2020). Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 19(3), 1110–1124.
- Mirás V.I. (2019). Estudio de la población de bacterias ácido lácticas en un embutido cárnico mediante MALDI TOF. Tesis fin de grado, Universidad de Valladolid, España.
- Mogensen, G. (1995). Realities and trends in probiotic attributes of lactic acid bacteria and their market impact. *Presses Universitaires de Caen, Caen, France*, 175–185.
- Molin, G.; Ternström, A. (1982). Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.*, 128, 1249–1264.
- Monroy, M.; Castro T.; Fernández, F. J.; Mayorga, L. (2009). Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *Contactos*, 73: 63–72.
- Montassier, E.; Valdés-Mas, R.; Batard, E.; Zmora, N.; Dori-Bachash, M.; Suez, J.; & Elinav, E. (2021). Probiotics impact the antibiotic resistance gene reservoir along the human GI tract in a person-specific and antibiotic-dependent manner. *Nat. Microbiol.*, 6(8), 1043–1054.
- Montville, T.J. ; Chen, Y. (1998). Mechanistic action of pediocin and nisin: recent progress and unresolved questions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 511–519.

- Mora, D.; Musacchio, F.; Fortina, M.G.; Senini, L.; Manachini, P.L. (2003). Autolytic activity and pediocin-induced lysis in *Pediococcus acidilactici* and *Pediococcus pentosaceus* strains. *J. Appl. Microbiol.*, 94, 561-570.
- Naidu, A. S. (2000). *Natural food antimicrobial systems*. CRC press (Ed.).
- Najjari, A.; Ouzari, H.; Boudabous, A.; & Zagorec, M. (2008). Method for reliable isolation of *Lactobacillus sakei* strains originating from Tunisian seafood and meat products. *Int. J. Food Microbiol.*, 121(3), 342-351.
- Navarro, U.C. (2017). Análisis proteómico de las vías de señalización mediadas por la subunidad Ga Pga1 de una proteína G heterotrimérica de *Penicillium chrysogenum*. Tesis doctoral, Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- NCSS. (2007). Update (version 1). Available online: <https://www.ncss.com/download/ncss/updates/ncss-2007-v1/> (accessed on 22 May 2022).
- Nesvizhskii, A. I.; Keller, A.; Kolker, E.; Aebersold, R.A. (2003). Statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 75 (17), pp 4646–4658.
- Noriega, L.; Gueimonde, M.; Sánchez, B.; Margolles, A.; De Los Reyes-Gavilán, C.G. (2004). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.*, 94, 79–86.
- Papadimitriou, K.; Alegría, Á.; Bron, P. A.; De Angelis, M., Gobbetti, M., Kleerebezem, M.; *et al.* (2016). Stress physiology of lactic acid bacteria. *Microbiol. Mol.*, vol. 80, no 3, p. 837-890.
- Párraga Solórzano, P. K.; Shupe, A. C.; and Kehl-Fie, T. E. (2021). The sensor histidine kinase ArlS Is necessary for *Staphylococcus aureus* to activate ArlR in response to nutrient availability. *Journal of bacteriology*, 203(24), e00422-21.
- Pennacchia, C.; Vaughan, E. E.; & Villani, F. (2006). Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat sci.*, 73(1), 90-101.
- Pérez-Chabela, M.D.L.; Totosaus, A.; Guerrero, I. (2008). Evaluation of thermotolerant capacity of lactic acid bacteria isolated from commercial sausages and the effects of their addition on the quality of cooked sausages. *Food. Sci. Technol.*, 28, 132-138.
- Rafii, F.; and Park, M. (2008). Detection and characterization of an ABC transporter in *Clostridium hathewayi*. *Arch. Microbiol.*, 190(4), 417-426.
- Ramirez-Chavarin, M. L.; Wachter, C.; Eslava-Campos, C. A.; & Perez-Chabela, M. L. (2013). Probiotic potential of thermotolerant lactic acid bacteria strains isolated from cooked meat products. *International Food Research Journal.*, 20(2).
- Rocchetti, M. T., Bellanger, T., Trecca, M. I., Weidmann, S., Scrima, R., Spano, G., ... & Fiocco, D. (2022). Molecular chaperone function of three small heat-shock proteins from a model probiotic species. *Cell Stress and Chaperones*, 1-11.
- Ruíz-Ramírez, Y.; Guadarrama-Mendoza, P. C.; Escalante, A.; Giles-Gómez, M.; & Valadez-Blanco, R. (2022). Probiotic activity traits *in vitro* and production of antimicrobial peptides by *Lactobacillaceae* isolates from pulque using *Lactobacillus acidophilus* NCFM as control. *Braz. J. Microbiol.*, 53(2), 921-933.
- Ruppé, É.; Woerther, P. L.; & Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Ann. Intensive care*, 5(1), 1-15.
- Salminen, S.; Laine, M.; Vonwright, A.; Vuopio-Varkila, J.; Korhonen, T.; & Mattila-Sandholm, T. (1996). Development of selection criteria for probiotic strains to assess

- their potential in functional foods: a Nordic and European approach. *Biosi. Microflora*, 15(2), 61-67.
- Sánchez, L.; Tromps, J. (2014). Caracterización *in vitro* de bacterias ácido lácticas con potencial probiótico. *Rev. Salud Anim.*, 36, 124–129.
- Sanders, M. E. (1993). Effect of consumption of lactic cultures on human health. *Adv. Food Nutr. Res.*, 37, 67-130.
- Savedboworn, W.; Riansa-ngawong, W.; Sinlapacharoen, W.; Pajakang, S.; Patcharajarukit, B.; Tipkanon, S.; Phattayakorn, K. (2014). Assessment of probiotic properties in lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables. *Int. J. Appl. Sci. Tech.*, 7, 53–65.
- Seemann T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, Jul 15;30(14):2068-9. PMID:24642063.
- Sgorbati, B.; Biavati, B.; & Palenzona, D. (1995). The genus *Bifidobacterium*. In *The genera of lactic acid bacteria*, (pp. 279-306). Springer, Boston, MA.
- Sharma, M.; Wasan, A.; & Sharma, R. K. (2021). Recent developments in probiotics: An emphasis on *Bifidobacterium*. *Food Biosci.*, 41, 100993.
- Sherman, Brad T.; *et al.* (2022). DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). *Nucleic Acids Res.*, vol. 10.
- Shida, T.; Hattori, H.; Ise, F.; and Sekiguchi, J. (2001). Mutational analysis of catalytic sites of the cell wall lytic *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidases CwIc and CwIV. *JBC.*, 276(30), 28140-28146.
- Śliżewska, K.; Chlebicz-Wójcik, A.; & Nowak, A. (2021). Probiotic properties of new *Lactobacillus* strains intended to be used as feed additives for monogastric animals. *Probiotics Antimicrob. Proteins*, 13(1), 146-162.
- STATISTICA. (2004). (Version 7) Available online: <https://www.tibco.com/products/data-science> (Accessed on 22 May 2022).
- Stiles, M. E.; Holzapel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.*, 36(1), 1-29.
- Sun, F.; Hu, Y.; Chen, Q.; Kong, B.; Liu, Q. (2019). Purification and biochemical characteristics of the extracellular protease from *Pediococcus pentosaceus* isolated from Harbin dry sausages. *Meat Sci.*, 156, 156-165.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. (2005). Pediocin ST18, an anti-listerial bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* ST18 isolated from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. *Process Biochemistry*, 40(1), 365-370.
- Vásquez, S. M.; Suárez, H.; Zapata, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne. *Rev. Chil. Nutr.*, 36(1), 64-71.
- Ventura, M.; Turróni, F.; Van Sinderen, D. Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioeng. Bugs*. 2012, 3, 73-79.
- Vidhyasagar, V., & Jeevaratnam, K. (2013). Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties *in vitro*. *Journal of Functional foods*, 5(1), 235-243.
- Weckx, S., Van der Meulen, R., Allemeersch, J., Huys, G., Vandamme, P., Van Hummelen, P., & De Vuyst, L. (2010). Community dynamics of bacteria in sourdough fermentations as revealed by their metatranscriptome. *Applied and environmental microbiology*, 76(16), 5402-5408.

- Wessels, S.; Axelsson, L.; Bech Hansen, E. De Vuyst, L. Laulund, S.; Lahteenmaki, L.; Lindgren, S.; Mollet, B.; Salminen, S. von Weight, A. (2004). The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. *Trends Food Sci Technol.*, 15:498-505.
- Xu, H.; Jeong, H.S.; Lee, H.Y.; Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Lett. Appl. Microbiol.*, 49, 434–442.
- Yang, S. J.; Kim, K. T.; Kim, T. Y.; & Paik, H. D. (2020). Probiotic properties and antioxidant activities of *Pediococcus pentosaceus* SC28 and *Levilactobacillus brevis* KU15151 in fermented black gamju. *Foods*, 9(9), 1154.
- Yousef, A. E.; Luchansky, J. B.; Degnan, A. J.; & Doyle, M. P. (1991). Behavior of *Listeria monocytogenes* in wiener exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* H or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(5), 1461-1467.
- Zhang, H. ; Zhang, C. ; Liu, H. ; Chen, Q. ; & Kong, B. (2021). Proteomic response strategies of *Pediococcus pentosaceus* R1 isolated from Harbin dry sausages to oxidative stress. *Food Biosci.*, 44, 101364.
- Zheng, J.; Wittouck, S.; Salvetti, E.; Franz, C. M.; Harris, H.; Mattarelli, P.; O’Toole, P.W.; Pot, B.; Vandamme, P.; Walter, J.; *et al.* (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 70, 2782-2858.
- Zhu, W., Smith, J. W., & Huang, C. M. (2009). Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010.
- Zommiti, M. ; Bouffartigues, E. ; Maillot, O. ; Barreau, M. ; Szunerits, S. ; Sebei, K. ; Feuilloley, M. ; Connil, N. ; Ferchichi, M. (2018). *In vitro* assessment of the probiotic properties and bacteriocinogenic potential of *Pediococcus pentosaceus* MZF16 isolated from artisanal Tunisian meat “dried ossban”. *Front. Microbiol.*, 9, 1-15.

17 ANEXOS

17.1 Selección de cepa con mayor potencial biotecnológico

17.1.1 Aislamiento

Las 15 cepas previamente aisladas de chorizo tipo español por el grupo de trabajo [Juárez-Castelán *et al.*, 2019], fueron propagadas y sembradas en cajas Petri con medio MRS-verde de bromocresol, en la **Fig. 11**, se observa el vire que tuvo el verde de bromocresol a amarillo en el medio debido a la producción de ácido láctico de las cepas, la morfología que mostraron las colonias (color, tamaño), fueron de un solo tipo morfológico, redondas, pequeñas, coloración crema en el centro y circunferencia grisácea. No se observó contaminación, por lo que se procedió a asilar cada colonia.

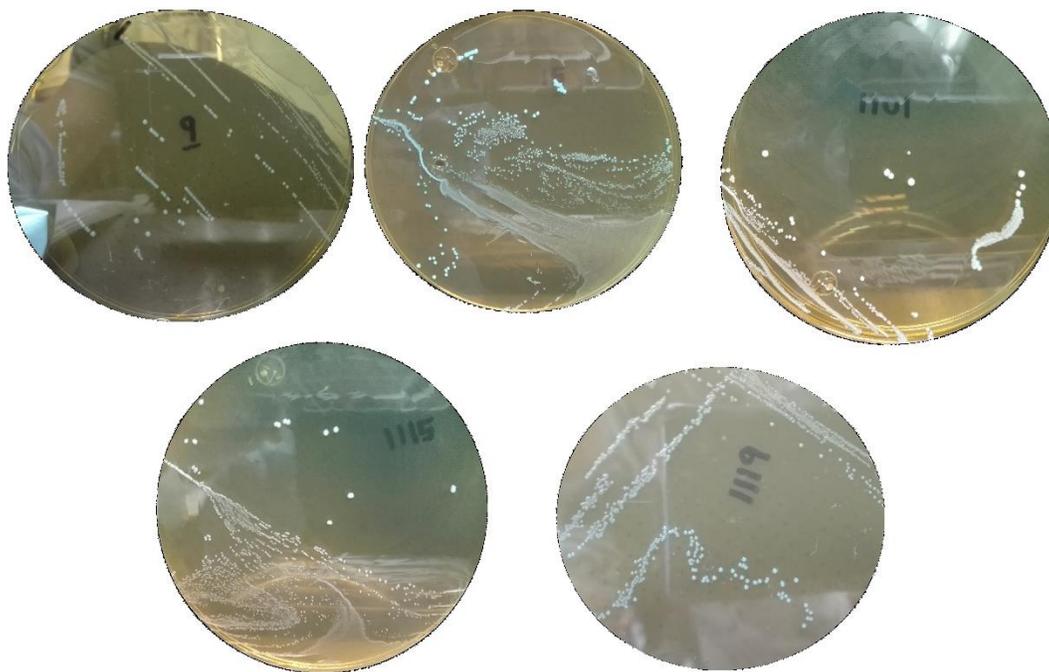


Figura 11. BAL aisladas en MRS-verde de bromocresol

17.1.2 Actividad antagónica y proteolítica

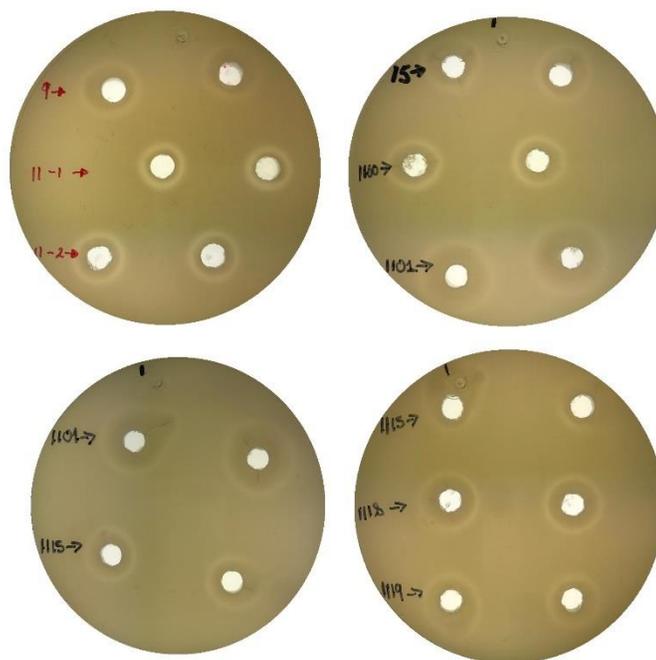


Figura 12. Actividad proteolítica: cepas 9,15,1101, 1115 y 1119.

En la **tabla 9**, se resumen los resultados de la actividad antagónica y proteolítica que presentaron las 15 cepas de la colección; en la actividad proteolítica, los halos de hasta 1 mm de diámetro indicaron una reacción débilmente positiva (-); de 1 a 5 mm reacción positiva (+); halos > 5 a 10 mm reacción positiva (++) y halos > 10 mm reacción positiva (+++) (Silveira et al. 1999).

Tabla 9. Actividad antimicrobiana de las 15 cepas aisladas de chorizo tipo español.

Clave de identidad	<i>Escherichia coli</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Weisella</i>	Actividad proteolítica
9	+	+	+	-	-	++
11-1	+	+	-	+	-	+
11-2	+	+	+	+	-	+
15	+	+	+	+	-	++
1100	+	+	+	+	-	++
1101	+	+	+	+	+	+++
1102-1	+	+	+	+	-	++
1102-2	-	+	+	+	-	++
1107	-	+	+	+	-	++
1109-1	+	+	+	+	+	++

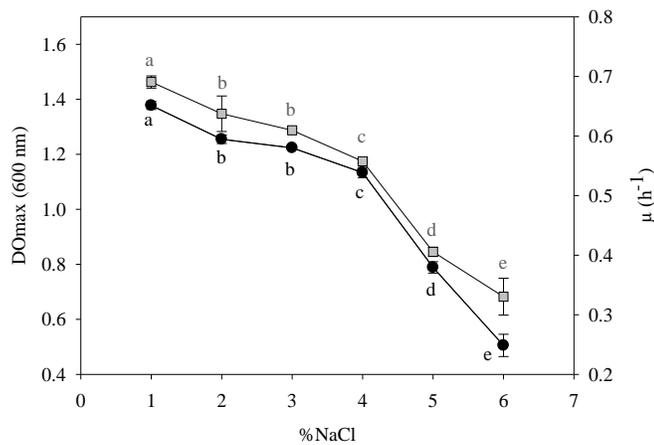
1109-2	+	+	+	+	+	++
1113	+	+	+	+	+	++
1115	+	+	+	-	-	++
1118	+	+	+	-	+	++
1119	+	+	+	-	-	++

:- ≤ 1mm; +: >1-5 mm; ++: > 5-10 mm; +++: >10 mm.

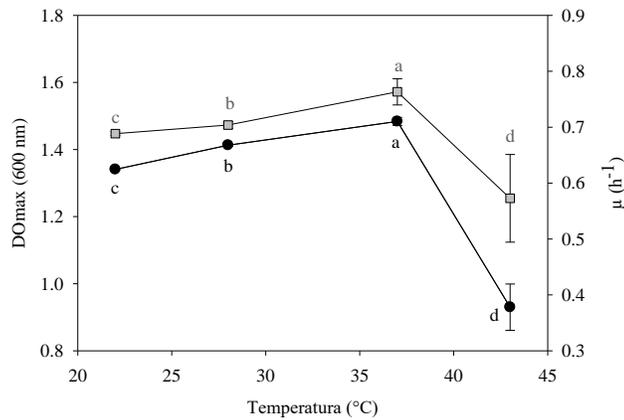
La cepa 1101 fue la que presentó mayor actividad antagónica y proteolítica en comparación con la colección de 14 cepas restantes.

17.1.3 Parámetros cinéticos a diferente concentración de NaCl y diferente temperatura

La **figura 13** muestra el efecto de la concentración de NaCl y la temperatura sobre la tasa de crecimiento (μ) y la densidad óptica máxima (DO_{max}) de *P. pentosaceus* 1101. El crecimiento de la cepa 1101 se vio afectado por el aumento de las concentraciones de NaCl hasta el 6% (**figura 13a**), ya que tanto la DO_{max} como la μ disminuyeron significativamente. El efecto de la temperatura sobre los parámetros cinéticos se muestra en la **figura 13b**, donde la DO_{max} aumentó hasta 37°C (1.484 ± 0.012), pero se observaron valores más bajos a temperaturas de incubación más altas, lo que indica una termotolerancia inherente.



(a)

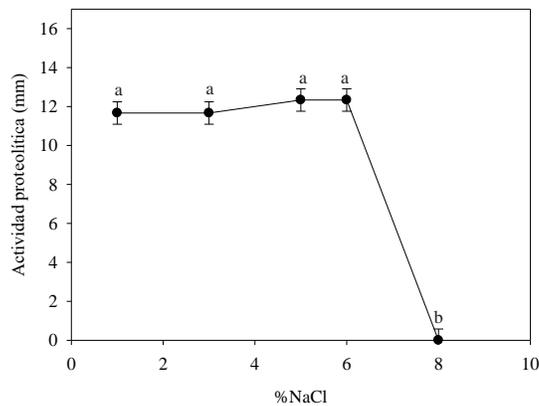


(b)

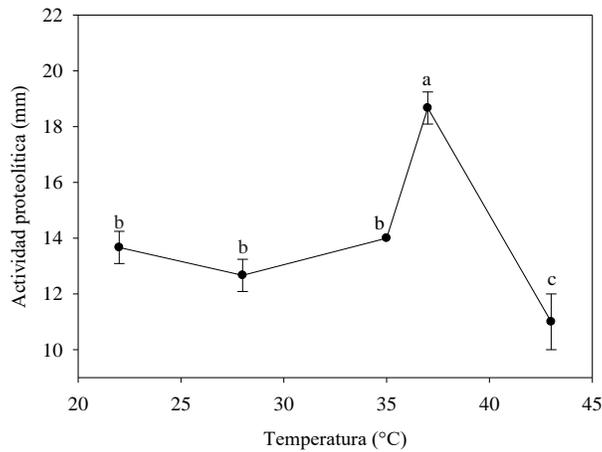
Figura 13. Influencia del pH, la concentración de NaCl y la temperatura sobre el crecimiento de *P. pentosaceus* 1101, (D.O._{max} (●), μ (■)). (a): diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y (b): diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0.05$) según la comparación múltiple de medias de Duncan.

17.1.4 Actividad proteolítica a diferente concentración de NaCl y temperatura

P. pentosaceus 1101 no mostró diferencias significativas en la actividad proteolítica en presencia de NaCl (**Figura 14a**). La temperatura de incubación afectó a la actividad proteolítica de la cepa, aumentando su actividad desde los 22°C (13.667 ± 0.577 mm) hasta los 37°C (18.667 ± 0.577 mm), y disminuyendo drásticamente cuando la cepa se cultivó a 43°C (**Figura 14b**).



(a)

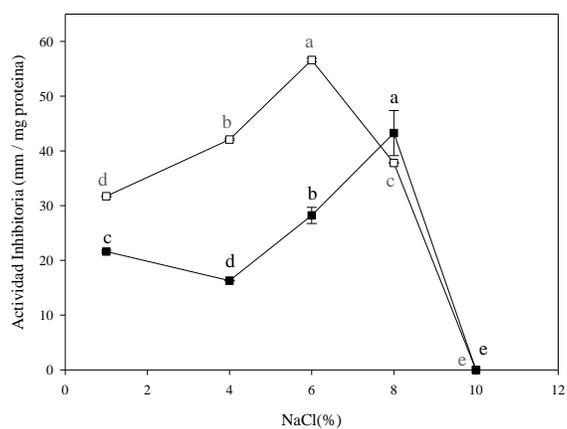


(b)

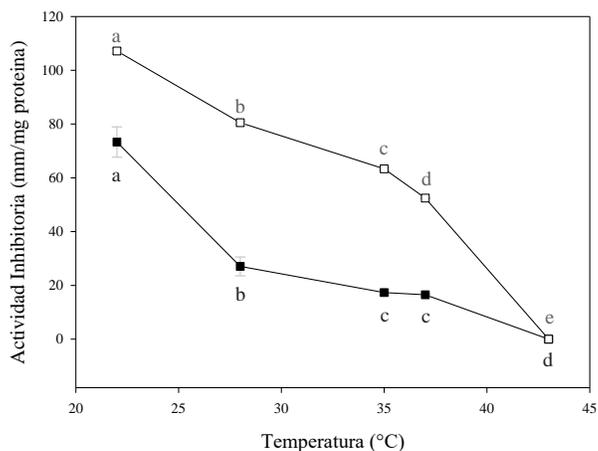
Figura 14. Curvas de actividad proteolítica de *P. pentosaceus* 1101. (a): Diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y temperatura constante de 37°C; (b): diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres cultivos diferentes. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$) por comparación múltiple de medias de Duncan.

17.1.5 Actividad inhibitoria a diferente concentración de NaCl y temperatura

La actividad inhibitoria de la cepa se evaluó para mostrar la influencia de la concentración de NaCl y la temperatura. La actividad inhibitoria se vio favorecida a una temperatura de 22 °C (**figura 15b**). La actividad inhibitoria de la cepa en estudio se ve favorecida con un aumento de la concentración de NaCl en el medio hasta un valor del 8% p/v (**figura 15a**). Sin embargo, estas condiciones afectaron profundamente al crecimiento, probablemente debido al estrés osmótico (**figura 13a**). La actividad inhibitoria fue mayor para *L. innocua* en comparación con *E. faecalis* en todos los tratamientos probados.



(a)



(b)

Figura 15. Curvas de actividad inhibitoria con *Enterococcus faecalis* (■) y *Listeria innocua* (□) de *P. pentosaceus* 1101. (a) Diferente concentración de NaCl con pH inicial de 7.0 y temperatura constante de 37°C; (b) diferente temperatura con pH inicial de 7.0. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los valores representados son la media con desviación estándar de tres experimentos independientes realizados con tres diferentes

La cepa 1101 fue seleccionada para su evaluación debido a las ventajas que presentó en su espectro de inhibición, actividad proteolítica y prevalencia a lo largo del proceso de maduración de un producto cárnico fermentado (chorizo de tipo español) del que fue aislada previamente por el grupo de trabajo [Juárez-Castelán *et al.*, 2019].

17.2 Determinación de la concentración de proteína

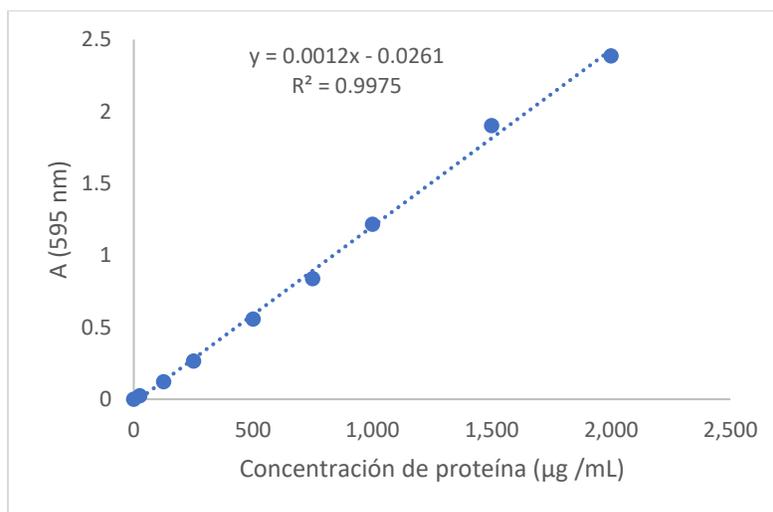


Figura 5. Curva estándar para la determinación de proteína por el método de Bradford.

18 PRODUCTOS OBTENIDOS

18.1 Artículo de investigación

Escobar-Sánchez, M., Carrasco-Navarro, U., Juárez-Castelán, C., Lozano-Aguirre Beltrán, L., Pérez-Chabela, M. L., & Ponce-Alquicira, E. (2023). Probiotic Properties and Proteomic Analysis of *Pediococcus pentosaceus* 1101. *Foods*, *12*(1), 46.

<https://doi.org/10.3390/foods12010046>

18.2 Artículo de revisión

Escobar, M., & Alquicira, E. P. (2019). *Pediococcus pentosaceus*: cultivo iniciador con potencial probiótico en la industria cárnica. *Nacameh*, *13*(2), 37-47.

[Nacameh - Volumen 13 \(uam.mx\)](#)

18.3 Participación en eventos especializados

SMBB, XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 23-28 de junio de 2019, León, Guanajuato, México.

Article

Probiotic Properties and Proteomic Analysis of *Pediococcus pentosaceus* 1101

Monserrat Escobar-Sánchez ¹, Ulises Carrasco-Navarro ¹, Carmen Juárez-Castelán ², Luis Lozano-Aguirre Beltrán ³, M. Lourdes Pérez-Chabela ¹ and Edith Ponce-Alquicira ^{1,*}

¹ Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Ciudad de México 09340, Mexico

² Cinvestav, Departamento de Genética y Biología Molecular, Ciudad de México 07360, Mexico

³ Unidad de Análisis Bioinformáticos del Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Cuernavaca 62210, Mexico

* Correspondence: pae@xanum.uam.mx; Tel.: +52-55-58044600 (ext. 2676)

Abstract: *Pediococcus pentosaceus* 1101 was identified by using 16S rRNA and MALDI-Biotyper. The strain was exposed to conditions that resemble the gastrointestinal tract (GT) to evaluate its probiotic properties. That included the growth kinetics, proteolytic and inhibitory activities within a pH range, survival at low pH and in the presence of bile salts, antagonistic activity, cell-adhesion properties, and antibiotic resistance. The evaluation was followed by a genomic and proteomic analysis that involved the identification of proteins obtained under control and gastrointestinal conditions. The strain showed antagonistic activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria, high resistance to acidity (87% logarithmic survival rate, pH 2) and bile salts (99% logarithmic survival rate, 0.5% *w/v*), and hydrophobic binding, as well as sensitivity to penicillin, amoxicillin, and chloramphenicol. On the other hand, *P. pentosaceus* 1101 has a genome size of 1.76 Mbp, with 1754 coding sequences, 55 rRNAs, and 33 tRNAs. The proteomic analysis showed that 120 proteins were involved in mechanisms in which the strain senses the effects of acid and bile salts. Moreover, the strain produces at least one lytic enzyme (*N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase; 32 kDa) that may be related to the antimicrobial activity. Therefore, proteins identified might be a key factor when it comes to the adaptation of *P. pentosaceus* 1101 into the GT and associated with its technological and probiotic properties.

Keywords: proteomic analysis; antimicrobial activity; *Pediococcus pentosaceus*; probiotic



Citation: Escobar-Sánchez, M.; Carrasco-Navarro, U.;

Juárez-Castelán, C.; Lozano-Aguirre Beltrán, L.; Pérez-Chabela, M.L.;

Ponce-Alquicira, E. Probiotic Properties and Proteomic Analysis of *Pediococcus pentosaceus* 1101. *Foods* **2023**, *12*, 46. <https://doi.org/10.3390/foods12010046>

Academic Editor: Célia C.G. Silva

Received: 22 November 2022

Revised: 10 December 2022

Accepted: 16 December 2022

Published: 22 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

At present, probiotics have been used in the production of several functional foods, dietary supplements, and biopharmaceuticals [1]. The term “probiotic” refers to a culture of live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a benefit to the health of the host, such as immunomodulatory, anticancer, lipid-lowering, and antagonistic effects on pathogenic bacteria, that reinforce the intestinal barrier and balance the intestinal microbiota [2,3]. Most probiotics in humans belong to the lactic acid bacteria group (LAB) [4] that is commonly employed to produce several fermented food products, including dairy, meats, and vegetables. Probiotic strains comprise members of the genera *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus*, among others, and are generally recognized as safe [5].

It has been established that microbial isolates intended to be used as probiotics must meet several criteria, such as their ability to survive through the upper gastrointestinal (GI) tract and tolerate human gastric juices, as well as human bile and pancreatic secretion during transit through the intestine. Probiotic bacteria must also show adherence to epithelial surfaces to survive in the host GI and exert their beneficial activities on it [6]. Colonization of the gut by probiotic bacteria may prevent the growth of harmful bacteria by competitive exclusion, modulation of the immune system, and the production of organic



***Pediococcus pentosaceus*: cultivo iniciador con potencial probiótico en la industria cárnica**

***Pediococcus pentosaceus*: starter culture with probiotic potential in the meat industry**

Monserrat Escobarⁱ, Edith Ponce-Alquiciraⁱⁱ

Departamento de Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Av. San Rafael Atlixco 186, Iztapalapa 09340, Ciudad de México, México. ✉ Autor de correspondencia: pae@uam.xanum.mx.

Resumen

Esta revisión tiene por objetivo describir el potencial probiótico de *Pediococcus pentosaceus* dentro de la industria cárnica sustentada en diversos estudios. Se consultaron revistas especializadas en ciencia, microbiología de alimentos y otras relacionadas con probióticos, cuyo descriptor principal fue *Pediococcus pentosaceus*. En general los reportes encontrados desde el año 2000 a la fecha, muestran evidencia en donde se ha determinado la supervivencia de *P. pentosaceus* aislado de carne fresca, cultivos comerciales iniciadores de carne, productos cárnicos cocidos y secos, siendo este microorganismo tolerante a condiciones ácidas similares a las del tracto gastrointestinal e intestino delgado (pH 3.0-5.0), muestra resistencia hasta 2% de concentración de sales biliares, una alta capacidad de auto-agregación y co-agregación; además exhibe inhibición del crecimiento de patógenos intestinales Gram positivos y Gram negativos. Por tanto, se constató que *Pediococcus pentosaceus* es una bacteria probiótica prometedora y también que existe poca investigación sobre el crecimiento de *Pediococcus pentosaceus* y su relación con la calidad, las propiedades organolépticas, el microambiente y la vida útil de la carne cuando se utiliza como cultivo iniciador.

Palabras claves: *Pediococcus pentosaceus*, probióticos, bacterias ácido lácticas, productos cárnicos, cultivos iniciadores.

Abstract

This review aimed to describe the probiotic potential of *Pediococcus pentosaceus* in the meat industry supported by different studies. Several journals specialized in food science,

ⁱ orcid.org/0000-0002-8645-9108

ⁱⁱ orcid.org/0000-0002-0797-9165

CRECIMIENTO Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE *PEDIOCOCCUS ACIDILACTICI* 1101 EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA

Montserrat Escobar, Carmen Juárez, Edith Ponce, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Departamento de Biotecnología, Ciudad de México 09340, escobar.ibi@hotmail.com.

Palabras clave: *Pediococcus acidilactici*, Cinética, temperatura.

Introducción. La cepa *Pediococcus acidilactici* 1101 ha sido identificada y aislada de chorizo tipo español por el grupo de trabajo, esta cepa presentó una actividad antagonista importante por lo que, para obtener una mejor comprensión de la relación entre su crecimiento, producción de compuestos antimicrobianos y factores ambientales, se llevaron a cabo cinéticas a diferentes temperaturas.

Metodología. Para confirmar el género y especie de la cepa se amplificó un segmento de la cadena de ADN utilizando cebadores universales para ADN_r 16S mediante la técnica de PCR. Se preparó un cultivo inoculado al 1% con la cepa, durante 24h a 37°C en caldo MRS para lactobacilos, se determinó la densidad óptica con una A_{600nm} de 0.8. Para iniciar el crecimiento, se inoculó al 1% el caldo MRS ajustado a pH 7.0, se colocaron 200 ul de cada muestra y blanco por triplicado, se corrieron cinéticas a 10, 16, 22, 37, 43 y 50 °C por 24 h en un lector de placas (Biotek). Los parámetros cinéticos se obtuvieron ajustando los datos de crecimiento a un modelo logístico con el programa STATISTICA 7 y se analizaron estadísticamente mediante el software NCSS 2007. Se determinaron por técnica en placa, la actividad antagonista de la cepa con agar MRS, actividad proteolítica mediante agar caseína, y actividad lipolítica con agar-tributirina, todas las pruebas se incubaron a 37°C durante 24 h.

Resultados. La cepa de estudio fue identificada como *Pediococcus acidilactici* por 16S, mostró una tendencia de crecimiento que implica una fase de latencia, una fase logarítmica y una fase estacionaria. Se puede observar en la Fig. 1, que la cepa puede crecer entre 22 y 43 °C a un pH inicial de 7.0. Por debajo de 22°C y por encima de 43°C no se detectó crecimiento en las cinéticas de 24 h. En la Tabla 1, se muestra que la D.O. máx aumenta teniendo su punto máximo a los 37°C y decrece después de esta temperatura al llegar a los 43°C, en el caso de μ máx no existe diferencia significativa entre 22°C y 37°C, éstas sí se diferencian de μ máx a los 43°C. Como se observa en la Fig. 2, la cepa tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de todos los microorganismos probados y de producir metabolitos con actividad proteolítica a 37°C, no se detectó actividad lipolítica.

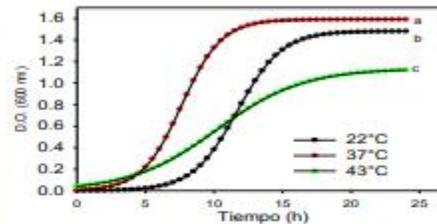


Fig. 1. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento. Letras diferentes indican diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla 1. Tasa específica de crecimiento máxima y crecimiento máximo.

Temperatura (°C)	22	37	43
D.O. máx	1.4693 ^b	1.6044 ^a	1.1405 ^c
μ máx (h^{-1})	0.6160 ^a	0.6304 ^a	0.3192 ^b

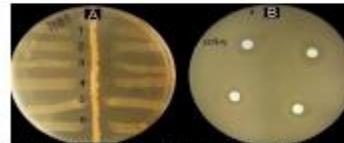


Fig. 2. A, Actividad antagonista: 1, *Escherichia coli*; 2, *Leuconostoc*; 3, *Listeria monocytogenes*; 4, *Salmonella typhimurium*; 5, *Staphylococcus aureus*; 6, *Weissella*. B, halos de actividad proteolítica alrededor de la colonia.

Conclusiones.

P. acidilactici 1101 muestra un crecimiento de tipo sigmoide, con μ máx y D.O. máx óptimos que fueron alcanzados con una temperatura de 37°C a la que también se detectó actividad antagonista y proteolítica, es posible que su actividad antimicrobiana se lleve a cabo de manera simultánea con el crecimiento celular, siguiendo un perfil cinético similar como han reportado otros autores (1). Presenta actividad contra microorganismos de importancia en salud pública como *Listeria*, *Salmonella* y *S. aureus*.

Agradecimientos. Los autores agradecen al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca de Doctorado a Monserrat Escobar.

Bibliografía.

1. Zhang, J., et al. (2012). *App Biochem Biotechnol.* 166:1388-1400.





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 0476

Matrícula: 2163802053

Propiedades probióticas y análisis proteómico de *Redifococcus pentasacaeus* 1101.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 15:00 horas del día 27 del mes de febrero del año 2023 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA
- DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
- DR. LUIS FERNANDO LOZANO AGUIRRE BELTRAN
- DR. ULISES CARRASCO NAVARRO



MONSERRAT ESCOBAR SANCHEZ
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA
DE: MONSERRAT ESCOBAR SANCHEZ

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISOR



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. MARIA DE LOURDES PEREZ CHABELA

VOCAL



DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

VOCAL



DR. LUIS FERNANDO LOZANO AGUIRRE BELTRAN

SECRETARIO



DR. ULISES CARRASCO NAVARRO