



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología

Aislamiento y caracterización de *Lactocaseibacillus paracasei* nativa del pulque con actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*

T E S I S

Que para obtener el grado de:

Licenciada en Ingeniería en Biotecnología

P R E S E N T A

Sabrina Macias Robles

Directora de tesis

Dra. Margarita Islas Pelcastre

Comité tutorial

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Dr. Vicente Vega Sánchez

Dr. Cristián Raziél Delgado González



Tulancingo de Bravo, Hgo.02 de Junio, 2025

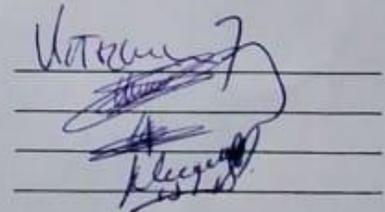
Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo., a 02 de Junio de 2025
Numero de Control: IBT-002-2025
Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado al pasante de Licenciatura en Ingeniería en Biotecnología, **Sabrina Macias Robles**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Aislamiento y caracterización de *Lacticaseibacillus paracasei* nativa del pulque con actividad antibacteriana contra *Listeria monocytogenes*”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

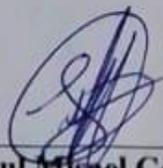
A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez
SECRETARIO Dr. Vicente Vega Sánchez
VOCAL 1 Dr. Cristián Raziél Delgado González
VOCAL 2 Dra. Margarita Islas Pelcastre

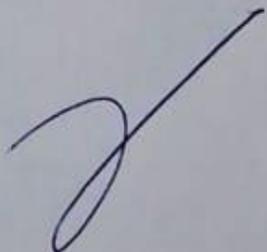


Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
 “Amor, Orden y Progreso”



Dr. Paul Misael Garza López
 Coordinador del Ingeniería en Biotecnología

Dr. Armando Peláez Acero
 Director del Instituto de Ciencias Agropecuarias

Avenida Universidad #133, Col. San Miguel Huatengo. C.P. 43775. Santiago Tulantepec de Lugo Guerrero, Hidalgo. México.
 Teléfono: 7717172000 Ext. 42000
 pelaeza@uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mi madre, quien ha estado conmigo, guiándome con amor, dedicación y fortaleza en cada etapa de mi vida. Su apoyo ha sido incondicional desde mis primeros pasos en la infancia, pasando por cada ciclo escolar, hasta llegar a la culminación de mis estudios universitarios. Este logro es también suyo, fruto de los incontables sacrificios que hizo por mí y del ejemplo de perseverancia que siempre me ha dado. Gracias por ser mi base, mi impulso y mi refugio constante.

A mi novio, Ricardo Ramírez Padilla, por apoyarme durante toda la carrera de todas las maneras posibles, por estar siempre para mí de forma incondicional y brindarme su amor y comprensión todo el tiempo.

A mi hermana, por ser una fuente constante de inspiración. Siempre quise ser la mejor versión de mí para que pudiera verse reflejada en un buen ejemplo.

A mis directores de tesis: a la Dra. Margarita Islas Pelcastre, por su acompañamiento y guía constante desde el inicio hasta la culminación de este proyecto, y al Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez, por su generosidad al compartir sus conocimientos, así como por su paciencia y el tiempo dedicado a mi formación.

A todas las personas que contribuyeron a la realización de este trabajo, gracias por la ayuda, los recursos, los conocimientos y el tiempo que me brindaron a lo largo del proyecto. De manera especial, al Dr. Vicente Vega Sánchez y al Dr. Cristian Raziél Delgado González, cuyo valioso apoyo fue decisivo para el desarrollo y conclusión de esta investigación.

Agradezco también a mi amiga, Briseyda Belén Barrios Morales, porque gracias a su compañía y amistad, los días en la universidad fueron más llevaderos y llenos de alegría.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	8
ÍNDICE DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN	13
II. REVISIÓN DE LITERATURA	15
2.1 El contexto del pulque.....	15
2.2 La diversidad bacteriana en el pulque.....	16
2.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL).....	16
2.4 Géneros representativos de las BAL.....	17
2.4.1 Lactococcus	17
2.4.2 Lactobacillus.....	17
2.4.3 Lacticaseibacillus	18
2.4.4 Leuconostoc.....	18
2.4.5 Weissella.....	18
2.5 Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas	19
2.5.1 Métodos de aislamiento y medios de cultivo para BAL.....	19
2.5.2 Identificación bioquímica para BAL.....	19
2.5.3 Identificación molecular mediante secuenciación del gen ARNr 16S.....	20
2.6 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL.....	21
2.6.1 Ácidos orgánicos, diacetilo y reuterina.....	21
2.6.2 Bacteriocinas.....	22
2.7 Biosíntesis de compuestos antimicrobianos.....	24
2.7.1 Metabolismo de los carbohidratos para producción de ácidos orgánicos.....	25
2.7.2 Metabolismo del ácido cítrico para la producción de diacetilo.....	28

2.7.3 Metabolismo del glicerol para la producción de reuterina	29
2.7.4 Biosíntesis de bacteriocinas	30
2.8 Métodos de análisis para la medición de actividad antimicrobiana.....	32
2.8.1 Métodos fenotípicos	32
2.8.2 Métodos automatizados	33
2.8.3 Métodos genotípicos	33
2.8.4 Métodos emergentes.....	33
2.9 Potencial biotecnológico de las bacteriocinas	34
2.9.1 Aplicaciones en la industria alimentaria.....	35
2.9.2 Aplicaciones en la farmacéutica	35
2.9.3 Aplicaciones en la agricultura y veterinaria	36
2.10 Parámetros cinéticos de crecimiento y consumo en procesos de fermentación	37
III. OBJETIVOS	39
3.1 General.....	39
3.2 Específicos	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. JUSTIFICACIÓN.....	41
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
6.1 Sitio de muestreo.....	42
6.2 Material biológico.....	42
6.3 Aislamiento y purificación de cepas	43
6.4 Pruebas bioquímicas preliminares	43
6.5 Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana	44
6.6 Fermentación por lote	44
6.6.1 Producción de sustancia antimicrobiana extracelular	44
6.6.2 Medición de densidad óptica	45
6.6.3 Concentración de biomasa húmeda	45

6.6.4 Medición de pH	45
6.6.5 Determinación de azúcares reductores totales	46
6.6.6 Determinación de proteína	46
6.7 Actividad antimicrobiana	46
6.7.1 Concentración de la actividad antimicrobiana.....	46
6.7.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana	47
6.7.3 Efecto de proteasas sobre la actividad antimicrobiana	47
6.8 Identificación molecular de la bacteria productora de compuestos antimicrobianos	48
6.8.1 Extracción de ADN	48
6.8.2 PCR gen 16S ARNr bacteriano	49
6.8.3 Purificación del amplificado	50
6.8.4 Secuenciación de gen	50
6.8.5 Identificación genética	50
6.9 Análisis Estadístico	51
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
7.1 Selección de bacteria.....	52
7.2 Actividad antimicrobiana	53
7.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana	53
7.2.2 Efecto de la proteasa sobre la actividad antimicrobiana	57
7.3 Identificación molecular de la bacteria productora de compuestos antimicrobianos	58
7.3.1 Extracción de ADN	58
7.3.2 PCR gen 16S ARNr bacteriano y purificación del amplificado	58
7.3.3 Identificación genética	59
7.4 Cinética de la fermentación por lote.....	61
7.4.1 Cinéticas de crecimiento: densidad óptica y producción de biomasa húmeda.....	61
7.4.2 Evolución del pH	64
7.4.3 Evolución de la concentración de azúcares reductores	65

7.4.4 Evolución de la concentración de proteína	67
7.5 Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano	68
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	74

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas (Gu, 2023 a; Sharma et al., 2022).....	22
Tabla 2. Efecto del ajuste de pH y la presencia de CaCO ₃ en el medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana del sobrenadante.....	54
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos obtenidos durante la cinética de fermentación de <i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta metabólica de la fermentación de la glucosa por bacterias homofermentativas. Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 178) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.	26
Figura 2. Ruta metabólica de la fermentación de la glucosa por bacterias heterofermentativas. Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 181) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.	27
Figura 3. Ruta metabólica de la fermentación de las pentosas por bacterias ácido lácticas. Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 182) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.	28
Figura 4. Metabolismo del ácido cítrico. Tomado de “Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage” (p. 113), por M. G. Gänzle, 2015.	29
Figura 5. Biosíntesis de reuterina. Adaptado de “A metabolic reconstruction of <i>Lactobacillus reuteri</i> JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory”, por Kristjansdottir et al., 2019.	30
Figura 6. Biosíntesis de bacteriocinas de clase IIa a través de sistemas de transducción de señales, que consta de tres componentes, como el péptido inductor (IP), la proteína reguladora de respuesta (RR) y el sensor de histidina quinasa transmembrana (HPK). Tomado de “The Progress of the Biotechnological Production of Class IIa Bacteriocins in Various Cell Factories and Its Future Challenges”, por Wang et al., 2024.....	31
Figura 7. Imagen satelital del sitio de muestreo. Google. (2025). Captura de pantalla de la ubicación del tinacal en Singuilucan, Hidalgo. Google Maps. https://www.google.com/maps	42
Figura 8. Tinción de Gram de la cepa seleccionada (100x) bacilos Gram positivos. Fuente: Elaboración propia.	53
Figura 9. Prueba de actividad antimicrobiana realizada con gotas de sobrenadantes libres de células obtenidos a diferentes horas contra <i>Listeria monocytogenes</i> . Fuente: Elaboración propia.	56
Figura 10. Comparación del efecto de la proteasa en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células contra <i>Listeria monocytogenes</i> . Fuente: Elaboración propia. ...	58
Figura 11. Espectro de absorbancia del ADN extraído. Fuente: Elaboración propia.	58
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa: MP indica el marcador de peso molecular, mientras que BAL1 y BAL2 corresponden al amplificado de la bacteria ácido láctica con una repetición, N es el negativo y los carriles con los números del 1 al 10 contienen muestras pertenecientes a otro proyecto con el mismo gen amplificado, correspondientes a otras cepas bacterianas. Fuente: Elaboración propia.	59
Figura 13. Relación filogenética de la bacteria ácido láctica BAL67 aislada de pulque. Las especies se infieren mediante el análisis Neighbor-joining del gen ARNr 16S, con base en las	

distancias evolutivas calculadas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura. Los números entre paréntesis corresponden a los números de acceso de la secuencia publicada. 60

Figura 14. Crecimiento microbiano de la cepa seleccionada aislada del pulque, evaluado mediante densidad óptica (Ln OD600) y biomasa húmeda (Ln g) en función del tiempo de incubación. La densidad óptica y la biomasa fueron transformadas mediante logaritmo natural (Ln) para facilitar la interpretación de las fases de crecimiento. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia. 63

Figura 15. Variación del pH y la densidad óptica (OD600) durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia. 65

Figura 16. Consumo de azúcares reductores y variación de la densidad óptica durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia. 66

Figura 17. Variación de la concentración de proteína y densidad óptica durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia. 68

Figura 18. Relación entre el crecimiento bacteriano y el consumo de azúcares reductores en función del tiempo durante las primeras 8 horas de fermentación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia. 69

Figura 19. Análisis de residuales de los valores simulados y experimentales de biomasa. Fuente: Elaboración propia. 71

Figura 20. Análisis de residuales de los valores simulados y experimentales de sustrato. Fuente: Elaboración propia. 71

RESUMEN

El pulque es una bebida tradicional mexicana obtenida mediante el proceso de fermentación del aguamiel. Durante su fermentación interviene una amplia diversidad de microorganismos, como bacterias y levaduras con un relevante potencial biotecnológico. En este estudio, se aisló y caracterizó una bacteria ácido láctica (BAL) nativa del pulque proveniente de un tinacal en Singuilucan, Hidalgo. La cepa fue identificada mediante secuenciación de ARNr 16S como *Lacticaseibacillus paracasei*. A través de fermentaciones a nivel matraz con medio de cultivo MRS (Man, Rogosa y Sharpe), se obtuvieron extractos con compuestos antimicrobianos y se evaluó su actividad contra *Listeria monocytogenes* mediante ensayos de difusión en agar por gota.

Se aplicaron dos tratamientos en las placas de agar. En el primer tratamiento, se utilizó agar infusión cerebro corazón (BHI) suplementado con 0.1% de CaCO_3 para neutralizar los ácidos orgánicos producidos por las bacterias, mientras que en el segundo tratamiento no se añadió CaCO_3 . Simultáneamente, el extracto con compuestos antimicrobianos también se sometió a dos condiciones: con ajuste de pH a 6.8 y sin ajuste de pH. Al combinar las condiciones del sobrenadante y del medio de cultivo, se evaluaron un total de cuatro tratamientos. Los resultados mostraron halos de inhibición en los tratamientos con sobrenadantes sin ajuste de pH, evidenciando la capacidad antimicrobiana de los extractos.

Además, se confirmó la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos mediante el tratamiento con proteasa, sugiriendo que pertenecen a la familia de las bacteriocinas. Por otro lado, se realizó un análisis cinético del crecimiento bacteriano y el consumo de sustrato, aplicando el modelo de Monod para estimar parámetros como la tasa máxima de crecimiento específica ($\mu_{\text{máx}}$), que resultó en 0.1674 h^{-1} , y la constante de saturación (K_s), de 11.33 g/L . Aunque el modelo no se ajustó completamente a los datos experimentales, permitió describir de manera general el comportamiento del cultivo durante la fermentación. Estos hallazgos destacan el valor del pulque como una fuente de microorganismos con potencial biotecnológico y su utilidad para el desarrollo de nuevos productos con aplicaciones en la industria alimentaria, farmacéutica y de la salud.

ABSTRACT

Pulque is a traditional Mexican beverage obtained through the fermentation of aguamiel. Its fermentation involves a wide diversity of microorganisms, including bacteria and yeasts, with significant biotechnological potential. In this study, a native lactic acid bacterium (LAB) was isolated and characterized from pulque collected in a tinacal located in Singuilucan, Hidalgo. The strain was identified through 16S rRNA sequencing as *Lacticaseibacillus paracasei*. Using flask-scale fermentations in MRS (Man, Rogosa, and Sharpe) broth, cell-free extracts containing antimicrobial compounds were obtained and evaluated for their activity against *Listeria monocytogenes* using agar drop diffusion assays.

Two treatments were applied to the agar plates. The first used brain heart infusion (BHI) agar supplemented with 0.1% CaCO₃ to neutralize organic acids produced by the bacteria, while the second did not include CaCO₃. Additionally, the antimicrobial extract was tested under two conditions: with pH adjustment to 6.8 and without adjustment. Combining these variables resulted in four different treatments. Inhibition halos were observed in treatments using extracts without pH adjustment, demonstrating antimicrobial activity.

Furthermore, protease treatment confirmed the proteinaceous nature of the antimicrobial compounds, suggesting they belong to the bacteriocin family. A kinetic analysis of bacterial growth and substrate consumption was also conducted using the Monod model. Parameters such as the maximum specific growth rate ($\mu_{max} = 0.1674 \text{ h}^{-1}$) and the saturation constant ($K_s = 11.33 \text{ g/L}$) were estimated. Although the model did not fully fit the experimental data, it provided a general description of the fermentation behavior. These findings highlight the value of pulque as a natural source of microorganisms with biotechnological applications, particularly in the food, pharmaceutical, and health industries.

I. INTRODUCCIÓN

La biotecnología se ha consolidado como una herramienta clave para el desarrollo de productos innovadores en sectores como la salud, la alimentación, la agricultura y el medio ambiente. Dentro de este campo, el aprovechamiento de microorganismos con propiedades funcionales ha permitido la obtención de compuestos bioactivos con aplicaciones industriales de alto valor. Particularmente, las bacterias ácido lácticas (BAL) se han estudiado ampliamente por su capacidad para fermentar sustratos naturales y sintetizar metabolitos como ácidos orgánicos, enzimas, exopolisacáridos y compuestos antimicrobianos, entre los que destacan las bacteriocinas.

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos ribosomales que presentan especificidad contra ciertos microorganismos y han sido propuestas como alternativas naturales en la conservación de alimentos, la prevención de enfermedades infecciosas y el desarrollo de productos con potencial terapéutico. Su producción está directamente relacionada con el crecimiento microbiano y responde a condiciones fisiológicas y ambientales particulares.

Por otro lado, el pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana obtenida del aguamiel del maguey (*Agave spp.*) y representa un reservorio microbiano de interés biotecnológico. Su fermentación espontánea involucra una comunidad microbiana compleja donde predominan bacterias ácido lácticas y levaduras. Diversos estudios han identificado cepas nativas del pulque con capacidad para producir compuestos antimicrobianos, lo que abre nuevas posibilidades para su aislamiento, caracterización y aplicación en procesos biotecnológicos.

Además del estudio de su actividad antimicrobiana, resulta fundamental comprender el comportamiento cinético del crecimiento microbiano, especialmente en sistemas fermentativos. Para ello, el modelo de Monod es una herramienta clásica que permite describir la relación entre la velocidad específica de crecimiento microbiano y la concentración de sustrato disponible. A través de este modelo, es posible estimar parámetros clave como la velocidad máxima específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) y la constante de semisaturación (K_s), los cuales proporcionan información útil para el diseño, optimización y escalado de procesos biotecnológicos.

En este contexto, el presente trabajo se enfoca en el aislamiento y caracterización de una cepa nativa de *Lacticaseibacillus paracasei* proveniente de pulque, con el objetivo de evaluar su capacidad para producir compuestos antimicrobianos y estimar parámetros cinéticos asociados a su crecimiento en condiciones controladas. Esta investigación busca contribuir al aprovechamiento de recursos microbianos tradicionales mediante herramientas biotecnológicas,

fortaleciendo su potencial en el desarrollo de soluciones sostenibles con aplicación en la industria alimentaria y de la salud.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 El contexto del pulque

De acuerdo a la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (2015), el pulque es tan famoso que se consume en toda la República Mexicana y parte de los Estados Unidos, pero las entidades que destacan tanto en producción como en consumo son: la Ciudad de México, Estado de México, Hidalgo, Tlaxcala, Morelos y Michoacán. Además, tradicionalmente, se le atribuyen propiedades medicinales, tales como que alivia trastornos gastrointestinales, estimula el apetito, combate la debilidad y mejora ciertos padecimientos renales, también recomiendan su consumo a las mujeres en etapa de lactancia para aumentar la secreción de leche y mejorar su calidad (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

El pulque representa un producto biotecnológico desarrollado por los antiguos mexicanos cientos de años antes de la época prehispánica (Rocha-Arriaga et al., 2020). Es una bebida alcohólica tradicional no destilada, de consistencia viscosa, color blanco lechoso; producida por la fermentación de la savia conocida como aguamiel, que se extrae de varias especies de Agaváceas como *Agave atrovirens* y *A. americana* (Escobar-Zepeda et al., 2020).

El proceso de fermentación del pulque, se lleva a cabo en “tinacales” (lugar donde se instalan los tinacos del pulque); donde se vierte el aguamiel y se mezcla con un inóculo conocido como “semilla” o “pie de pulque” y a partir de este momento comienza la fermentación y transformación del aguamiel en pulque, este proceso tarda aproximadamente 24 horas (Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, 2015).

De acuerdo al Reglamento para el control sanitario del pulque publicado en el Periódico Oficial del Gobierno Constitucional del Estado de México (1977), los tinacales deben ser lugares de fácil limpieza, libres de polvo o insectos, con ventanas que faciliten una iluminación y ventilación natural, con techos y paredes de material impermeable.

El aguamiel es el sustrato, que contiene las fuentes de carbono y energía, además de los compuestos necesarios para que los microorganismos fermentadores obtengan una diversidad de nutrientes sin complementación. Este sustrato está compuesto principalmente de sacarosa (8.8 %), fructosa (32.4%) y glucosa (26.5%), así como azúcares complejos como la inulina y los fructooligosacáridos del tipo inulina. Además, contiene proteínas, aminoácidos esenciales, vitaminas (C, B6, B2 y B1) y minerales (como potasio, calcio, hierro y zinc) (Escobar-Zepeda et al., 2020; Huezco-Sánchez et al., 2023).

2.2 La diversidad bacteriana en el pulque

El proceso de fermentación del pulque es realizado por una compleja diversidad microbiana compuesta por bacterias y levaduras. Este complejo microbioma, cataboliza los azúcares disponibles en el aguamiel, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa, para generar entre un 4% y un 7% de etanol metabolizado principalmente por microorganismos como *Zymomonas mobilis* y diferentes especies de *Saccharomyces*. Además, la característica ligeramente ácida de la bebida (que implica que el pH que oscila entre 3,5 y 4,2), resulta de la formación de ácido láctico y acético atribuidos a varias bacterias lácticas principalmente *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp. y *Leuconostoc* spp. y a las bacterias del ácido acético como *Acetobacter* spp., *Acinetobacter* spp. y *Gluconobacter*. Otra propiedad que se atribuye a la diversidad bacteriana del pulque es la viscosidad que resulta de transformación de dextrano (fracción de glucosa de la sacarosa) por varias especies de *Leuconostoc*, y de levano (fracción de fructosa de la sacarosa) por algunas especies de *Leuconostoc* y *Z. mobilis* (Astudillo-Melgar et al., 2023).

Diversas investigaciones han reportado la presencia de bacterias ácido lácticas en el pulque, confirmando su papel fundamental en el proceso de fermentación y en las propiedades de esta bebida. Estudios previos han identificado géneros como *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus* que además de influir en la calidad y sabor del pulque, han sido reconocidas por su capacidad para funcionar como probióticos al inhibir patógenos y restaurar el equilibrio microbiano (Huezo-Sánchez et al., 2023).

Los análisis de la diversidad bacteriana en muestras de pulque permiten afirmar que las bacterias ácido lácticas, son el grupo más abundante de microorganismos presente en el pulque. Por esta razón, su presencia permite considerar al pulque como un producto probiótico (Ballesteros-Rodríguez y Sánchez-Teyer, 2021).

2.3 Bacterias Ácido Lácticas (BAL)

Las bacterias ácido lácticas son un grupo de bacterias Gram positivas, no forman esporas, son aerotolerantes, y producen ácido láctico como uno de los productos principales mediante la utilización de carbohidratos durante la fermentación. Estas bacterias se pueden clasificar como organismos homofermentativos o heterofermentativos según su capacidad para fermentar carbohidratos. Las bacterias homofermentativas, producen dos moléculas de lactato a partir de una molécula de glucosa a través de la vía Embden-Meyerhof, mientras que las bacterias heterofermentativas generan lactato, etanol, dióxido de carbono y ácido acético a partir de una molécula de glucosa (Ayivi et al., 2020).

Las BAL se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, hoy en día, pueden encontrarse en lácteos fermentados, carnes, vegetales, tractos gastrointestinales y urogenitales, heces, suelo y agua (Flores-Maciel et al., 2024).

En la industria, las BAL son ampliamente utilizadas porque tienen un estatus “generalmente reconocido como seguro (GRAS)” de acuerdo con la Administración de Medicamentos y Alimentos de EE. UU. (FDA) y los criterios de presunción cualificada de seguridad (QPS) descritos por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Este grupo de bacterias son importantes porque desempeñan funciones esenciales en la conservación de los alimentos y contribuyen a sus propiedades nutricionales y sensoriales (Li y Han, 2018).

Dentro del sector agrícola, las bacterias ácido lácticas tienen potencial para ser usadas como biopesticidas o agentes de control biológico debido a su capacidad para producir una variedad de sustancias antimicrobianas como ácidos orgánicos, bacteriocinas, compuestos orgánicos volátiles y biosurfactantes que suprimen varios fitopatógenos. También pueden promover el crecimiento de las plantas al solubilizar altas cantidades de fosfato, potasio y al secretar enzimas proteolíticas y fitohormonas lo que las convierte en candidatos perfectos para sustituir los fertilizantes químicos. Además, el uso de las BAL en la descontaminación de suelos agrícolas se analiza exhaustivamente, debido a que varios estudios mostraron el gran potencial de cepas de BAL como biosorbentes o biodesintoxicantes de varios metales pesados (como Fe, Zn y Cd) (Lahmamsi et al., 2024).

2.4 Géneros representativos de las BAL

El grupo de bacterias ácido lácticas incluye aproximadamente 20 géneros diferentes. Sin embargo, los que se han reportado presentes en el pulque son *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, y *Weissella* (Astudillo-Melgar et al., 2023; Rocha-Arriaga et al., 2020).

2.4.1 *Lactococcus*

Bacterias ácido lácticas que anteriormente se incluían en el género *Streptococcus*. Integran a especies homofermentativas de bacterias ácido lácticas con forma de cocoide. Son bacterias Gram positivas, no forman endosporas, inmóviles, no son β -hemolíticas, se consideran anaerobias facultativas, se reporta como catalasa negativa y pueden crecer en un rango de 10 a 40 °C (Madigan et al., 2021; Teuber, 2015).

2.4.2 *Lactobacillus*

Suelen tener forma de bastón y crecen en cadenas, que varían desde bastoncillos largos y delgados hasta bastones cortos y curvados. La mayoría son homofermentativos y son comunes en los productos lácteos. Tienen una motilidad poco común, ya que solo se presenta cuando existen flagelos peritricos. Estas bacterias no forman esporas, son anaerobias facultativas, Gram positivas y se encuentran además en productos de cereales, productos cárnicos y pesqueros, cerveza, vino, frutas y jugos de frutas, verduras encurtidas, puré, chucrut, ensilaje, masa madre, agua, suelo y aguas residuales; forman parte de la flora normal de la boca, el tracto intestinal, en la vagina de las mujeres y de muchos animales (Hammes y Hertel, 2015; Madigan et al., 2021).

El *Lactobacillus* ha sido recientemente reclasificado a 25 nuevos géneros que incluyen al género *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* y 23 nuevos géneros con los siguientes nombres: *Amylolactobacillus*, *Acetilactobacillus*, *Agrilactobacillus*, *Apilactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Dellaglioia*, *Fructilactobacillus*, *Furfurilactobacillus*, *Holzapfelia*, *Lacticaseibacillus*, *Lactiplantibacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Latilactobacillus*, *Lentilactobacillus*, *Levilactobacillus*, *Ligilactobacillus*, *Limosilactobacillus*, *Liquorilactobacillus*, *Loigolactobacillus*, *Paucilactobacillus*, *Schleiferilactobacillus*, y *Secundilactobacillus* (Zheng et al., 2020).

2.4.3 *Lacticaseibacillus*

Las cepas de *Lacticaseibacillus* son homofermentativas; algunas metabolizan las pentosas a través de la vía de la fosfocetolasa. No son móviles, son oxidasa negativas y a menudo producen ácido D-láctico y L-láctico a partir de glucosa. El rango de temperatura para el crecimiento es variable, pero nunca por debajo de 10 °C y nunca por encima de 45 °C. Este género tiene una importancia económica considerable ya que alberga varias especies que se utilizan como cultivos iniciadores en fermentaciones lácteas y como probióticos, por ejemplo, *Lacticaseibacillus casei*, *Lacticaseibacillus paracasei* y *Lacticaseibacillus rhamnosus* (Hill et al., 2018; Zheng et al., 2020).

2.4.4 *Leuconostoc*

Sus células tienen forma de elipsoidales a esféricas, a menudo alargadas, generalmente en pares o en cadenas. Las cepas son Gram positivas, anaerobias facultativas, inmóviles y no producen esporas. Sin embargo, se destacan por ser heterofermentativas. Aunque su crecimiento puede ocurrir a un pH de 4,5, las especies no son acidófilas y prefieren un pH inicial de 6,5. La temperatura óptima de crecimiento es entre 20 y 30 °C, pero el crecimiento puede ocurrir a 5 °C. Son exigentes en sus requerimientos nutrimentales y comparten numerosos hábitats naturales y artificiales con otras BAL (Holzapfel et al., 2015).

2.4.5 *Weissella*

Su morfología microscópica consta de bastones cortos con extremos cónicos redondeados u ovoides y se presenta en pares o en cadenas cortas. Son Gram positivas, inmóviles, anaeróbicas facultativas, catalasa negativa y fermentan la glucosa de forma heterofermentativa. Los productos finales de la fermentación de la glucosa son CO₂, etanol y/o acetato. Su crecimiento ocurre a 15°C, y algunas especies crecen en un rango de 42 a 45°C (Björkroth et al., 2015).

2.5 Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas

2.5.1 Métodos de aislamiento y medios de cultivo para BAL

Las bacterias ácido lácticas constituyen un grupo bacteriano que está muy extendido en nichos naturales de fermentados, cárnicos y vegetales, en los tractos gastrointestinal y urogenital de humanos y animales, en el suelo y el agua (Ayivi et al., 2020).

Para el aislamiento de este grupo de bacterias Lahmamsi et al. (2024), refiere que se debe extraer asépticamente una porción de la muestra seleccionada, mezclarla con un medio de dilución, homogeneizarla, diluirla en serie, sembrarla en un medio selectivo y, finalmente, incubar en condiciones aeróbicas o anaeróbicas durante 48–72 h (en algunos casos se necesita un período de tiempo más largo, hasta 120 h) a 30–37 °C o 42 °C para BAL mesófilas o termófilas, respectivamente.

Los medios reportados para el aislamiento de BAL son principalmente el medio Man Rogosa Sharpe (MRS) y Agar Rogosa LBS para *Lactobacillus* spp., M17 para *Lactococcus* spp., y el medio Mayeux, Sandine & Elliker (MSE) para *Leuconostoc* spp. (López-Ramírez y Vélez-Ruiz, 2016).

2.5.2 Identificación bioquímica para BAL

Las pruebas bioquímicas se basan en las actividades metabólicas de las bacterias, incluyendo el uso de distintas fuentes de carbono y nitrógeno, la obtención de energía, la fermentación de azúcares, así como la producción de metabolitos secundarios, enzimas y toxinas. Estas pruebas son fundamentales para la identificación bacteriana, ya que permiten caracterizar fenotípicamente a los microorganismos y suelen representar una etapa previa a métodos de identificación genotípica o molecular (Roy et al., 2023; Tamang, 2014).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se caracterizan principalmente por ser Gram positivas, catalasa negativas y oxidasa negativas, además de poseer una morfología celular variada, como cocos o bacilos, y la capacidad de fermentar carbohidratos para producir ácido láctico como principal producto metabólico (Ayivi et al., 2020; Lahmamsi et al., 2024). Para confirmar estas

características, se emplean diversas pruebas. La tinción de Gram permite verificar la estructura de la pared celular, identificándolas como Gram positivas si se tiñen de color morado (Rodríguez y Arenas, 2018). La prueba de catalasa se utiliza para evaluar la presencia de la enzima catalasa, la cual generalmente está ausente en BAL, lo que las distingue de otras bacterias (Roy et al., 2023). Asimismo, la prueba de oxidasa suele resultar negativa, debido a que las BAL carecen de la enzima citocromo c oxidasa (Aslazadeh, 2006). Estas pruebas, en conjunto, son fundamentales para una primera aproximación en la identificación de este grupo microbiano.

Además de estas pruebas básicas, la identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas puede complementarse mediante sistemas comerciales estandarizados como el sistema de Índice de Perfil Analítico (API). El sistema API de bioMérieux (API System [SA], Francia) es un kit bioquímico para la identificación fenotípica de diferentes grupos de bacterias e incluso levaduras. La tira reactiva API 50 CHL permite determinar la capacidad fermentativa de 49 carbohidratos diferentes mediante una cepa aislada. El software de identificación de bases de datos APILAB PLUS (bioMérieux, Francia) utiliza un lector óptico controlado por computadora y tarjetas específicas para generar un perfil bioquímico y se utiliza para interpretar los resultados (Tamang, 2014).

2.5.3 Identificación molecular mediante secuenciación del gen ARNr 16S

Comúnmente, la identificación de bacterias ácido lácticas se inicia mediante métodos fenotípicos que incluyen la observación de la morfología celular, características fisiológicas, pruebas bioquímicas y la evaluación de la capacidad de fermentar distintos carbohidratos, así como el uso de sistemas comerciales como el kit API (Analytical Profile Index). Estas pruebas permiten una caracterización preliminar importante del aislamiento y proporcionan información funcional relevante. No obstante, debido a que la diferenciación precisa a nivel de especie puede ser limitada por similitudes fenotípicas entre cepas, la aplicación de herramientas moleculares como la secuenciación del ADN, resulta fundamental para confirmar y complementar la identificación, proporcionando un mayor nivel de precisión (Abdullah et al., 2021). Por lo tanto, la integración de métodos fenotípicos y moleculares es esencial para una caracterización bacteriana confiable y completa.

Hoy en día existen diferentes métodos de tipificación molecular, sin embargo, Lahmamsi et al. (2024) afirma que el más utilizado es la secuenciación del gen 16S rRNA, una técnica basada en reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ARNr 16S es una pequeña subunidad del ARN ribosómico bacteriano y el gen codificante de esta subunidad es el ADN ribosómico 16S (ADNr). La longitud total del ARNr 16S es de aproximadamente 1540 nucleótidos y está presente en los ribosomas de todas las bacterias. Esta secuencia contiene “regiones altamente conservadas” y “regiones hipervariables”. Las regiones conservadas reflejan las relaciones filogenéticas entre especies bacterianas y se pueden diseñar cebadores de amplificación universales en función de sus secuencias, mientras que las regiones altamente variables reflejan las diferencias entre especies bacterianas (Yang et al., 2024).

Para secuenciar el ARNr 16S es necesario seguir una serie de pasos fundamentales, que incluyen la extracción del ADN genómico, la amplificación mediante PCR, el proceso de secuenciación y el análisis bioinformático. Clarridge III (2004), Suárez-Contreras y Yañez-Menece (2020) describen el procedimiento comenzando con la toma de muestras, con precauciones meticulosas para evitar la contaminación y mantener la integridad de la muestra. Posteriormente, se extrae el ADN y se somete a rigurosas evaluaciones de calidad y concentración. Como siguiente paso, se realiza la amplificación por PCR dirigida a regiones específicas del gen ARNr 16s, utilizando cebadores específicos para este gen. Después de la amplificación, se emplea electroforesis en gel para verificar el tamaño y la pureza de los productos de PCR. Luego, la purificación de los productos de PCR se realiza utilizando kits de extracción en gel o kits de purificación de productos de PCR.

Una vez realizados los pasos anteriores, la muestra ya está lista para ser secuenciada. Hay varias plataformas de secuenciación disponibles. La primera generación de tecnología de secuenciación, representada por el método de terminación de cadena de didesoxinucleótidos de Sanger y el método de degradación química de Maxam, se implementó en 1977 y permitió la primera identificación completa de la secuencia genómica del bacteriófago phi X174. Más recientemente, se han desarrollado una serie de tecnologías de segunda generación, como la plataforma de secuenciación 454 de Roche, la plataforma SolexaGenomaAnalyzer de Illumina y la plataforma de secuenciación sólida de Applied Biosystems (ABI) (Yang et al., 2024).

2.6 Compuestos antimicrobianos producidos por BAL

2.6.1 Ácidos orgánicos, diacetilo y reuterina

Algunos antimicrobianos generados por las BAL, como lo refiere Ibrahim et al. (2021), son los ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido láctico. Sus propiedades antimicrobianas se han atribuido a moléculas disociadas que se desprotonan al entrar en las

membranas celulares. Otra causa de la acción antimicrobiana se debe al efecto concertado tanto de iones disociados como de moléculas no disociadas, que resultan en daño celular.

Otro compuesto antimicrobiano es el diacetilo, Ibrahim et al. (2021), reporta que es un compuesto volátil que se encuentra naturalmente en los productos lácteos fermentados, exhibiendo su actividad antimicrobiana al reducir el pH interno de los microorganismos. El ambiente ácido creado por el diacetilo desestabiliza la membrana celular microbiana, lo que provoca una pérdida de moléculas esenciales y, finalmente, la muerte celular (Ahansaz et al., 2023).

Ahansaz et al. (2023), también refiere que la reuterina, un compuesto orgánico de bajo peso molecular clasificado como 3-hidroxi-propionaldehído (3-HPA), posee propiedades antimicrobianas contra varias bacterias Gram positivas y Gram negativas, sintetizada por *L.reuteri*. Actúa induciendo estrés oxidativo dentro de las células microbianas. También, altera las membranas celulares microbianas, modifica el pH intracelular y daña el ADN.

2.6.2 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos sintetizados en ribosomas producidos por cepas bacterianas, que son letales para especies estrechamente relacionadas a las bacterias productoras (Sharma et al., 2022).

2.6.2.1 Clasificación de las bacteriocinas

Se clasifican en cuatro clases según su composición de aminoácidos, masa molecular, termoestabilidad, amplio espectro, genética de susceptibilidad enzimática, modo de acción, cepas productoras y tipos de modificaciones postraduccionales y tamaño (Sharma et al., 2022).

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas (Gu, 2023a; Sharma et al., 2022).

Clase	Características	Subdivisión	Descripción	Ejemplo (s)
Clase I (antibióticos)	Proteínas modificadas postraduccionamente, péptidos pequeños (<5 kDa) compuestos de 19 a 50 aminoácidos, estables al calor y que contienen residuos de aminoácidos inusuales llamados lantionina, b-metillantionina, deshidroalanina,	Clase Ia	Moléculas flexibles con forma de tornillo y carga positiva que tienen un peso molecular de 2 a 4 kDa. Hacen que se formen poros en las membranas celulares de sus organismos objetivo, lo que luego hace que la membrana citoplasmática de las	Nisina, Lacticina 3147

	laberintina y deshidrobutirina.		especies objetivo se despolarice.	
		Clase Ib	Péptidos globulares de 2 a 3 kDa sin carga neta o carga neta negativa que obstruyen procesos enzimáticos celulares como la formación de paredes celulares.	Lactocina S
Clase II (No lantibióticos)	Péptidos pequeños (<10 kDa), no modificados, de síntesis ribosomal, estables al calor, con contenido de glicina y llamados no lantibióticos	Clase IIa	Pequeños péptidos termoestables, que contienen la secuencia conservadora N-terminal YGNGV. Tienen un modo de acción como permeabilización de la membrana mediante la unión a los receptores manosa permeasa y tiene un fuerte efecto inhibidor sobre <i>Listeria monocytogenes</i> .	Pediocina PA-1
		Clase IIb	Bacteriocinas de dos péptidos, estos dos péptidos diferentes son muy necesarios para formar un complejo de poración activo para la permeabilización de la membrana.	Lactococinas
		Clase IIc	Bacteriocinas circulares en la que los extremos N y C están unidos covalentemente.	Acidocina B, Gassericina A
		Clase IId	Se componen de las bacteriocinas restantes que se clasifican como un grupo lineal de un solo péptido.	Lacticina Z
Clase III	Son moléculas grandes (>30 kDa), sensibles al calor y se clasifican en función de la actividad hidrolasa.	Clase IIIa	Tienen actividad similar a la hidrolasa y se denominan bacteriolisinas. Su modo de acción es permeabilizar la membrana y formar poros.	Lisostafina

	Clase IIIb	No tienen actividad hidrolasa y se denominan no líticas.	Enterolisina A, Helveticina J
Clase IV	Son bacteriocinas circulares muy complejas formadas por restos de lípidos o carbohidratos.		Enterocina Gr17, Lactocin 27

2.6.2.2 Mecanismo de acción de las bacteriocinas

Gu (2023b), refiere que el mecanismo detrás de la actividad bactericida de las bacteriocinas implica la formación de poros transmembrana comprometiendo la integridad de la membrana celular. Cuando las bacteriocinas forman poros en la membrana celular facilitan la disipación potencial de energía, que a su vez induce cambios significativos en las bicapas lipídicas, como alteraciones de la conductividad iónica. A medida que el paso de iones a través de los poros disminuye el gradiente de protones, altera el potencial de membrana celular, lo que provoca el bloqueo de las vías de producción de ATP y, en última instancia, la muerte celular. En línea con esto, Daba y Elkhateeb (2024) describen la formación de poros como el mecanismo de acción más común entre las bacteriocinas, señalando que estos poros pueden ser pequeños, provocando la fuga de iones como K^+ y Na^+ , o lo suficientemente grandes como para permitir la salida de moléculas más grandes como el ATP. Este fenómeno puede ser específico del objetivo o deberse al contacto electrostático entre bacteriocinas cargadas positivamente y los fosfolípidos de la membrana, cargados negativamente.

Daba y Elkhateeb (2024) también reportan otros mecanismos de acción para las bacteriocinas producidas por BAL:

- a) Inhibición en la síntesis de peptidoglicano: Se inicia cuando el péptido entra en contacto y se une al lípido II, el precursor de la pared celular, que previene el crecimiento de la cadena de peptidoglicano.
- b) Mecanismo de eliminación de receptores específicos dirigidos: Este mecanismo termina formando poros en la membrana de células sensibles después de atacar receptores de unión específicos en la membrana de células susceptibles.

2.7 Biosíntesis de compuestos antimicrobianos

Las bacterias ácido lácticas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de diversos microorganismos gracias a los metabolitos que producen. Estos compuestos comprenden

principalmente ácidos orgánicos, bacteriocinas y moléculas menores como peróxido de hidrógeno, acetaldehído, acetona, reuterina y reuterilina (Fatima et al., 2023).

2.7.1 Metabolismo de los carbohidratos para producción de ácidos orgánicos

Varios ácidos orgánicos que generan las bacterias del ácido láctico tienen propiedades antibacterianas (Fatima et al., 2023). El principal ácido orgánico sintetizado por las BAL es el ácido láctico. Sin embargo, dependiendo de las cepas de BAL y sus vías de fermentación, también pueden estar presentes otros ácidos orgánicos, incluidos el ácido fórmico y acético, especialmente en los procesos de BAL heterofermentativas (Ahansaz et al., 2023). De acuerdo al tipo de fermentación, las cepas de BAL se pueden clasificar en dos tipos, homofermentativas y heterofermentativas.

Las bacterias homofermentativas transforman casi todas las hexosas que utilizan, especialmente la glucosa, en ácido láctico. Dependiendo de la especie, se forma el isómero L- o D-lactato (Ribéreau-Gayon et al., 2021). En la vía homofermentativa, o vía de Embden-Meyerhof (figura 1), las bacterias del ácido láctico utilizan glucosa como fuente de carbono para producir piruvato mediante glucólisis y luego producen ácido láctico bajo la acción del lactato deshidrogenasa. En teoría, 1 mol de glucosa produce 2 moles de ácido láctico (Wang et al., 2021).

En un ambiente anaeróbico con una concentración limitada de glucosa, las bacterias homofermentativas como *Lactobacillus casei* forman menos ácido láctico y los productos primarios pueden convertirse en ácido acético, ácido fórmico y etanol. El cambio está relacionado con la regulación de la enzima lactato deshidrogenasa (Ribéreau-Gayon et al., 2021).

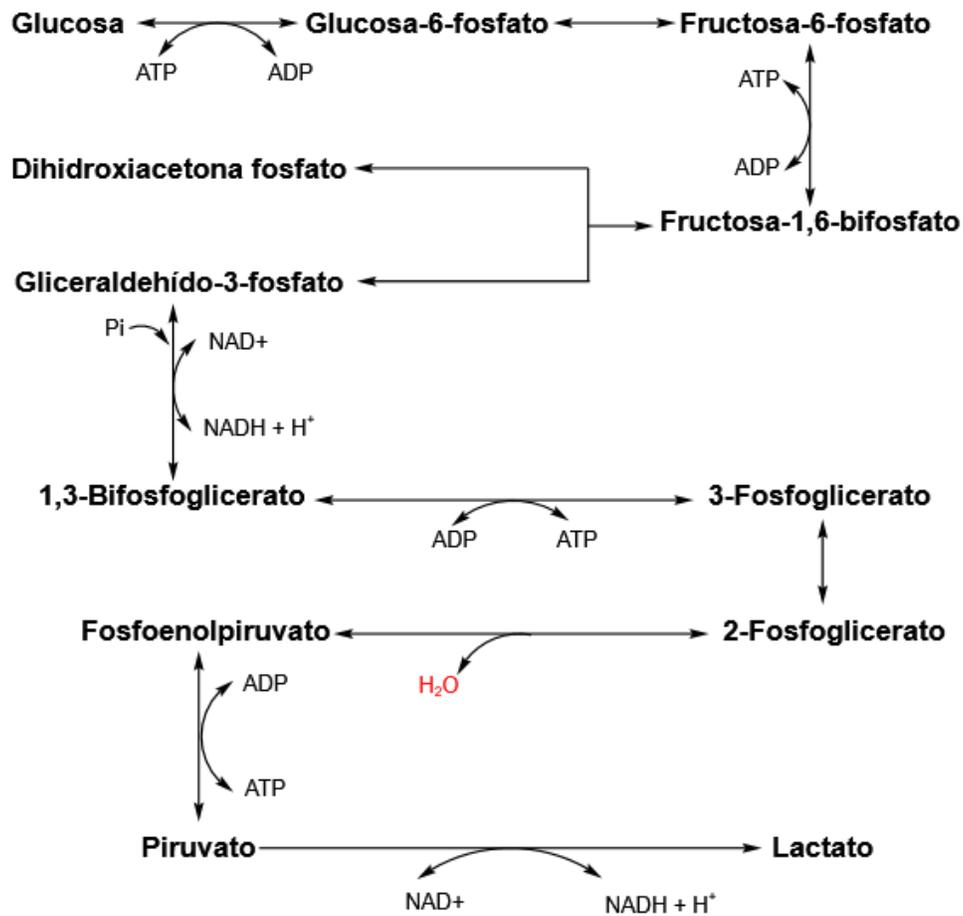


Figura 1. Ruta metabólica de la fermentación de la glucosa por bacterias homofermentativas.

Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 178) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.

Por otro lado, las bacterias que utilizan la vía heterofermentativa (figura 2) transforman las hexosas principalmente, en lactato y en otras moléculas como CO_2 , acetato y etanol; a través de la vía de las pentosas fosfato. En teoría, 1 mol de glucosa produce 1 mol de ácido láctico (Ribéreau-Gayon et al., 2021; Wang et al., 2021).

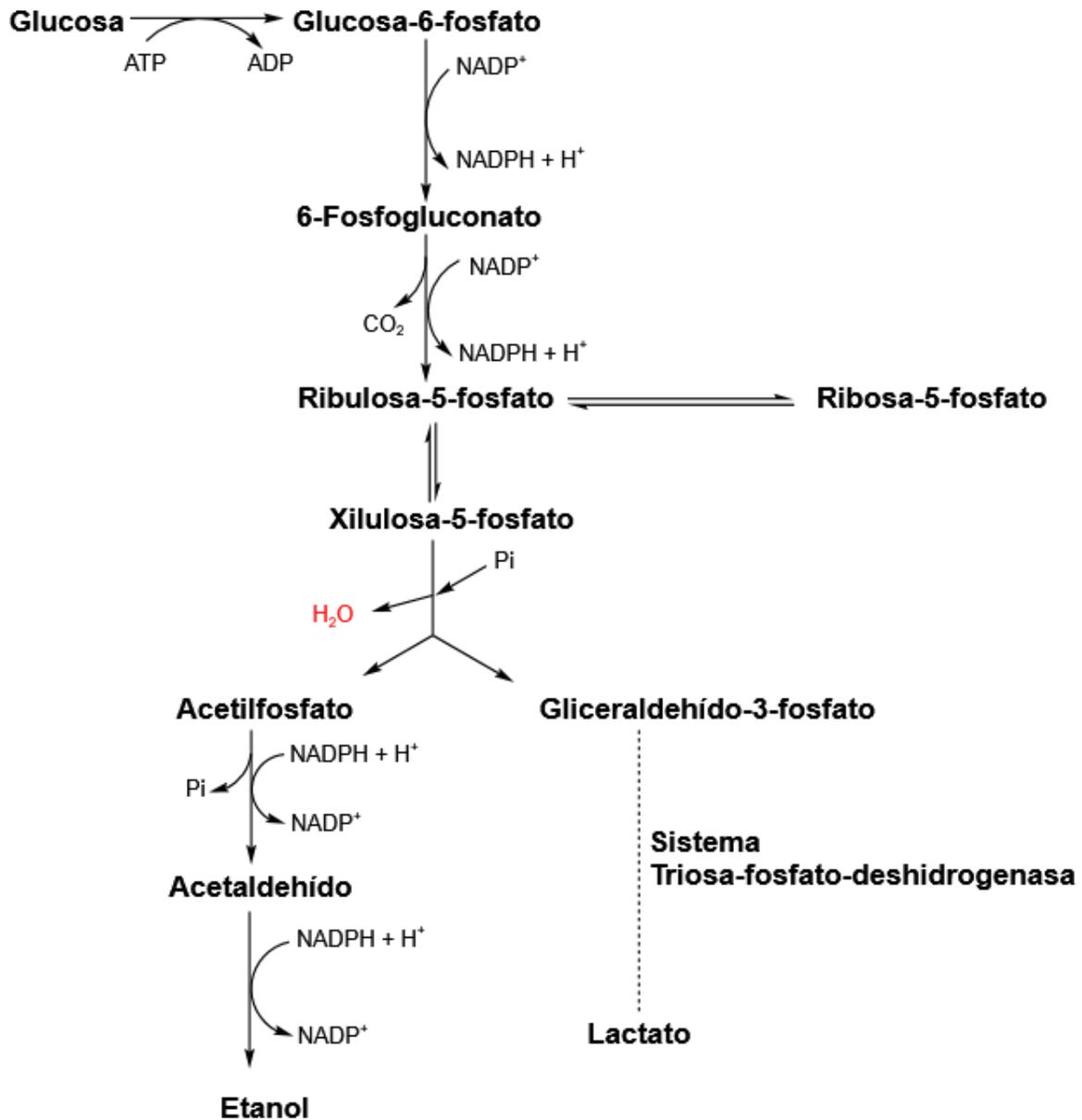


Figura 2. Ruta metabólica de la fermentación de la glucosa por bacterias heterofermentativas.

Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 181) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.

Ciertas cepas, como *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Oenococcus* o *Leuconostoc* fermentan pentosas como ribosa, arabinosa y xilosa, ya sean homofermentadores o heterofermentadores, (figura 3). Las pentosas se fosforilan mediante reacciones que involucran quinasas y uso de ATP. Luego, isomerasas específicas conducen a la formación de la molécula de xilulosa 5-P. Las reacciones posteriores se describen en la vía heterofermentativa para la asimilación de glucosa. Mientras que el gliceraldehído 3-P tiene el mismo destino en este caso, el acetil-P conduce

exclusivamente a la formación de la molécula de acetato, generando de esta manera una molécula de ATP. A diferencia del metabolismo de las hexosas, en esta vía no se dispone de una molécula de coenzima reducida para reducir el acetyl-P a etanol. Las pentosas son el origen del ácido acético además de la producción de ácido láctico (Ribéreau-Gayon et al., 2021).

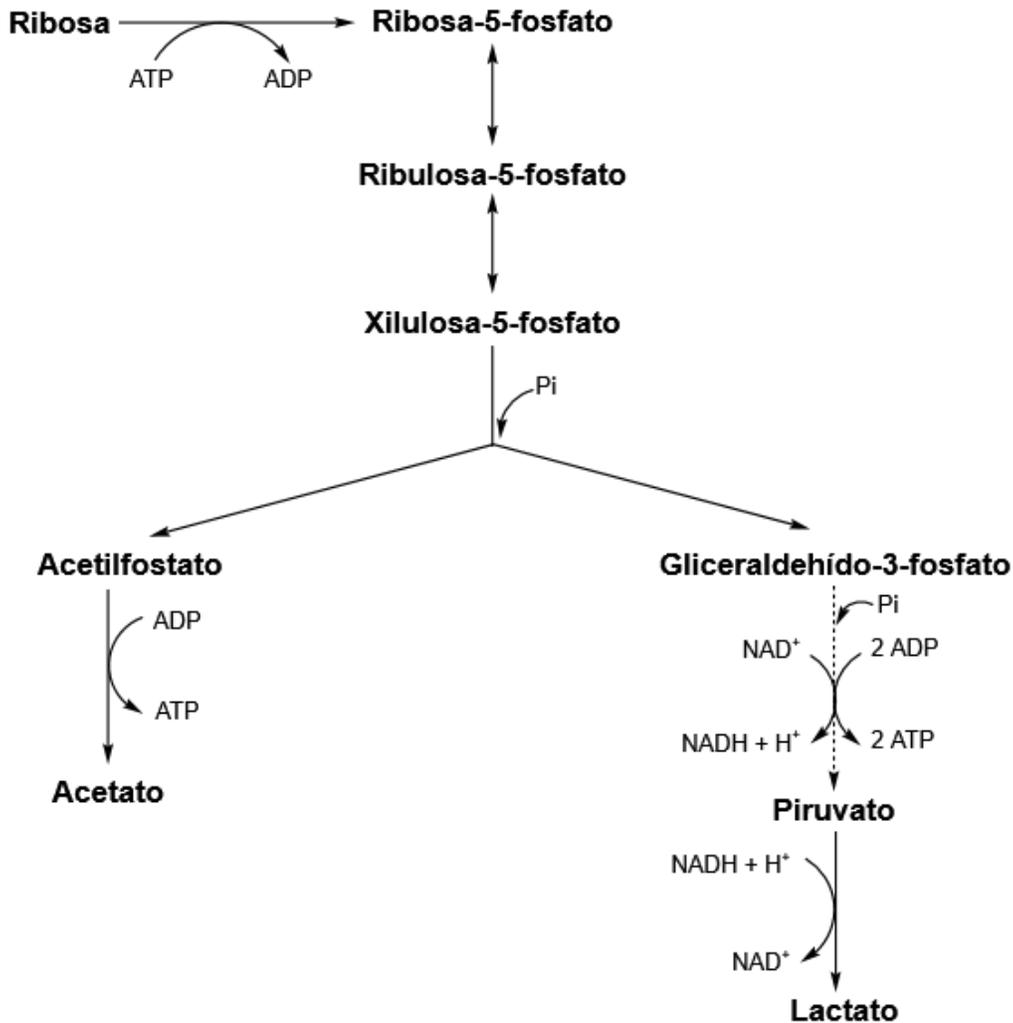


Figura 3. Ruta metabólica de la fermentación de las pentosas por bacterias ácido lácticas. Adaptado de Handbook of Enology volumen 1 (p. 182) por P. Ribéreau-Gayon et al., 2021.

2.7.2 Metabolismo del ácido cítrico para la producción de diacetilo

Las bacterias del ácido láctico pueden producir diacetilo, acetoína, butanodiol y otras sustancias en el proceso de metabolización del citrato. En el metabolismo del ácido cítrico (Figura 4), el ácido cítrico extracelular se transporta a la célula. Después de que el citrato ingresa a la célula, se convierte en acetato y oxaloacetato. Luego, el oxalacetato se descarboxila para producir piruvato y dióxido de carbono. Posteriormente, el piruvato puede metabolizarse en bacterias del ácido

láctico para producir diferentes productos finales, incluidos lactato, formiato, acetato y etanol, así como importantes compuestos aromáticos diacetilo, acetoína y butanodiol. El diacetilo es producido por el intermediario del metabolismo acetolactato mediante descarboxilación oxidativa. (Wang et al., 2021).

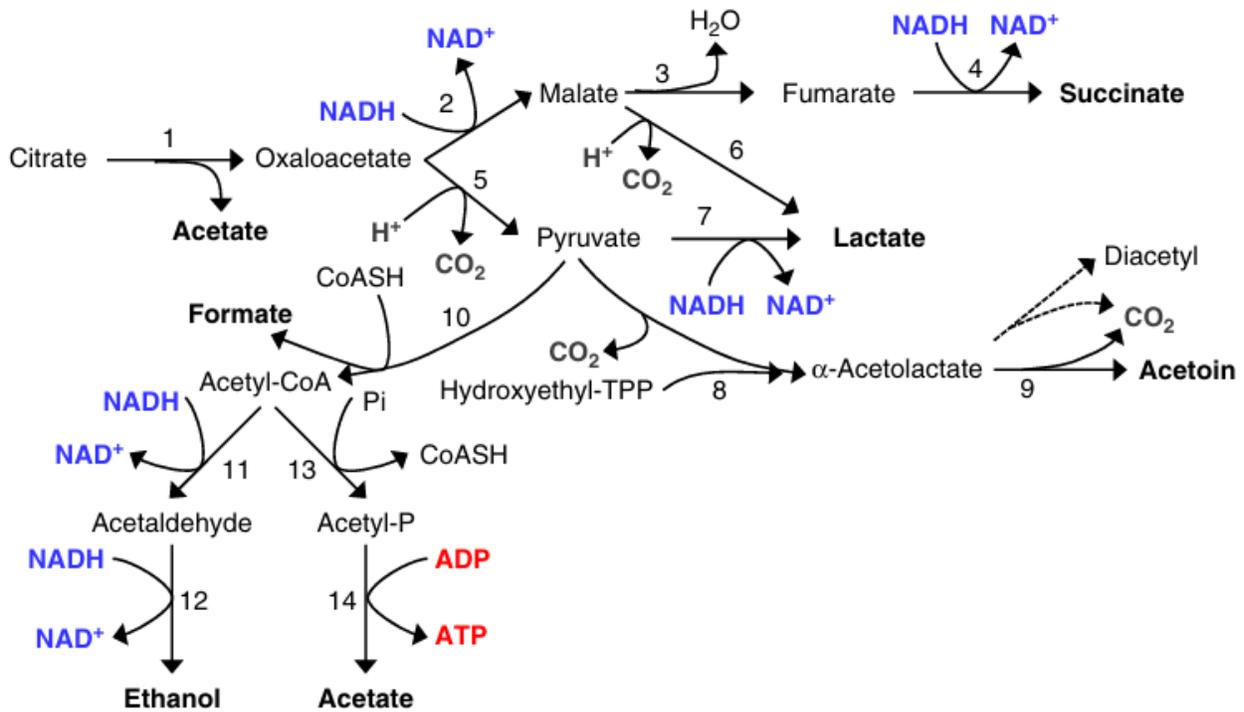


Figura 4. Metabolismo del ácido cítrico. Tomado de “Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage” (p. 113), por M. G. Gänzle, 2015.

2.7.3 Metabolismo del glicerol para la producción de reuterina

Las cepas de *Lactobacillus reuteri* producen una mezcla isomérica de 3-hidroxi propionaldehído, un metabolito secundario de tres carbonos comúnmente conocido como reuterina, durante el metabolismo del glicerol a 1,3-propanodiol (Figura 5) (Spinler et al., 2017).

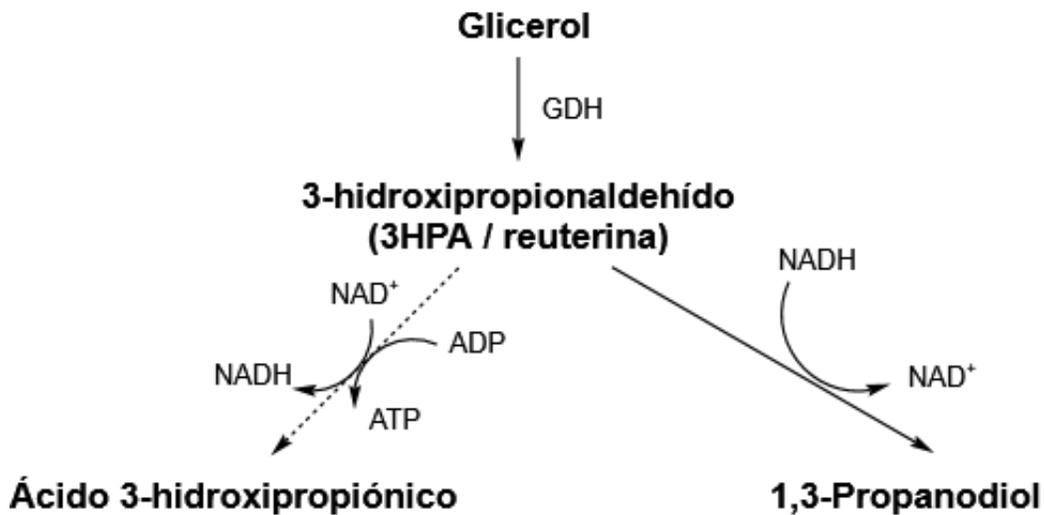


Figura 5. Biosíntesis de reuterina. Adaptado de “A metabolic reconstruction of *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory”, por Kristjansdottir et al., 2019.

2.7.4 Biosíntesis de bacteriocinas

La producción de bacteriocinas está regulada por mecanismos de señalización celular como el *quorum sensing*, que permite a las bacterias coordinar su síntesis en respuesta a la densidad celular y a otros factores ambientales (Arbulu y Kjos, 2024). Factores como la limitación de nutrientes, los cambios de pH, la temperatura y la tecnología de fermentación utilizada, influyen en la producción de bacteriocinas. De hecho, se ha sugerido que las condiciones de crecimiento desfavorables estimulan la producción de bacteriocinas (Liang et al., 2025; Maiwore y Ngang, 2023)

A nivel celular, los genes específicos que codifican la síntesis de bacteriocinas se ubican en plásmidos o en transposones insertados en el cromosoma. Estos pueden estar agrupados en uno o dos operones, conformados por los siguientes elementos:

- 1) Genes estructurales que codifican la pre-probacteriocina
- 2) Gen de inmunidad que ayuda a proteger la cepa productora de la propia bacteriocina
- 3) Genes que codifican la proteína responsable del procesamiento, transporte y secreción de la pre-probacteriocina
- 4) Gen de modificación que codifica la enzima responsable de las modificaciones postraduccionales de la probacteriocina

5) Gen regulador que codifica los componentes implicados en la regulación de la síntesis

El proceso de regulación se lleva a cabo mediante un sistema de transducción de señales de tres componentes que incluye el péptido inductor (IP), un sensor de histidina quinasa transmembrana (HPK) y una proteína reguladora de respuesta (RR). En este sistema, se produce un péptido inductor que se acumula progresivamente durante el crecimiento celular o aumenta su producción como respuesta a señales ambientales. Cuando alcanza un cierto umbral, el sensor de histidina quinasa transmembrana se autofosforila y transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta. El regulador de respuesta fosforilado se une a elementos diana del ADN y activa la transcripción y producción de genes de bacteriocina (Figura 7) (Arbulu y Kjos, 2024).

Las bacteriocinas se sintetizan en el ribosoma a través de una vía muy específica, que incluye la producción de prebacteriocina, posteriormente la escisión específica que elimina la secuencia líder y, finalmente, la translocación de la bacteriocina fuera de la membrana celular (Figura 7) (Sharma et al., 2022).

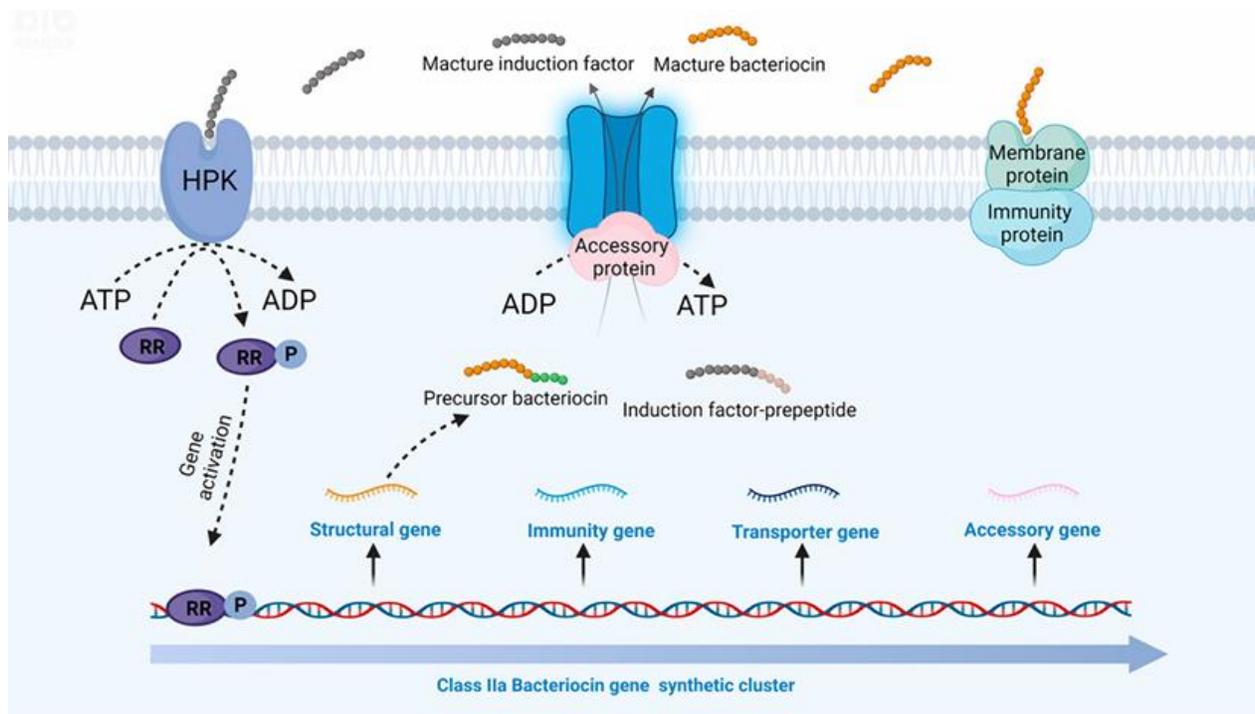


Figura 6. Biosíntesis de bacteriocinas de clase IIa a través de sistemas de transducción de señales, que consta de tres componentes, como el péptido inductor (IP), la proteína reguladora de respuesta (RR) y el sensor de histidina quinasa transmembrana (HPK). Tomado de “The

Progress of the Biotechnological Production of Class IIa Bacteriocins in Various Cell Factories and Its Future Challenges”, por Wang et al., 2024.

2.8 Métodos de análisis para la medición de actividad antimicrobiana

Los ensayos antimicrobianos *in vitro* desempeñan un papel crucial en el descubrimiento y desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos, proporcionando información crucial sobre su eficacia y sus mecanismos de acción (Hossain, 2024).

Existen diversos métodos de prueba para antimicrobianos, los cuales Benkova et al. (2020) y Salam et al. (2023) los clasifican en métodos fenotípicos convencionales, métodos automatizados, métodos genotípicos y emergentes.

2.8.1 Métodos fenotípicos

Los métodos fenotípicos convencionales se dividen principalmente en dos grupos, difusión en agar y dilución en el medio de cultivo.

Los ensayos basados en difusión en agar, son técnicas ampliamente utilizadas y rentables en la investigación antimicrobiana para determinar la actividad antimicrobiana de los compuestos de prueba. Estos incluyen diferentes variantes como difusión por disco, difusión en pocillos y difusión por gotas. Se basan en la difusión de agentes antimicrobianos desde discos de papel, pocillos o gotas colocadas en la superficie, hasta el medio de agar adyacente, inhibiendo el crecimiento del microorganismo de prueba inoculado en la superficie del agar. Al medir la zona de inhibición resultante (que representa el área donde el agente previene o inhibe el crecimiento microbiano), los investigadores pueden evaluar la potencia relativa del compuesto de prueba contra el microorganismo específico bajo investigación (Hossain, 2024).

Por otro lado, los métodos de dilución en caldo y en agar son muy utilizados debido a que mediante su uso se puede determinar la concentración más baja a la que el agente inhibe el crecimiento de microorganismos, es decir, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los agentes antimicrobianos (Gajic et al., 2022).

La elección entre los métodos de dilución en agar y en caldo puede depender de las características del agente antimicrobiano a evaluar. Por ejemplo, Benkova et al. (2020) señalan que la dilución en agar suele preferirse cuando se prueba un único compuesto frente a múltiples aislados o cuando el agente presenta características, como una coloración intensa, que podrían interferir con la detección del crecimiento microbiano en medios líquidos.

Por su parte, Hossain (2024) explica que la diferencia básica entre los métodos de dilución en agar y de dilución en caldo radica en el medio utilizado: la dilución en agar emplea placas de agar, mientras que la dilución en caldo utiliza tubos de caldo líquido. Sin embargo, ambos métodos implican la incorporación de diferentes concentraciones de la sustancia antimicrobiana al medio, seguida de la aplicación de un número estandarizado de células microbianas al medio. La CMI se determina observando el crecimiento o la ausencia de crecimiento del microorganismo.

2.8.2 Métodos automatizados

Según Salam et al. (2023), los métodos automatizados de prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos aprobados actualmente por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) son el sistema MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Inc. Atlanta, Georgia, EE. UU., 1980), VITEK 2 (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, Francia, 2000), el sistema de microbiología automatizado BD Phoenix (BD Diagnostics, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU., 2001) y Sensititre ARIS 2X (Trek Diagnostic Systems, OakwoodVillage, Ohio, EE. UU., 2004).

VITEK 2 y BD Phoenix detectan bacterias en crecimiento basándose en la turbidez, mientras que sistemas automatizados como MicroScan WalkAway y Sensititre ARIS 2X se basan en la emisión de fluorescencia de las bacterias en crecimiento. Además, todos los sistemas automatizados incorporan un software de sistema experto avanzado para un mejor rendimiento y procesamiento de datos en línea (Khan et al., 2019).

2.8.3 Métodos genotípicos

Gajic et al. (2022) señalan que los métodos genotípicos o moleculares de susceptibilidad a los antimicrobianos se basan en la detección directa de genes de resistencia específicos, así como mutaciones y la expresión de estos genes. Estos métodos moleculares se dividen en tres categorías: basados en amplificación, basados en hibridación o basados en secuencia.

En los métodos basados en amplificación, la secuencia del gen diana se amplifica para permitir la detección; en las técnicas basadas en hibridación, las sondas de ácido nucleico hibridadas apuntan a secuencias de genes que permiten la detección; y en los enfoques basados en secuencias, las secuencias del genoma se analizan para detectar mutaciones que confieren resistencia o genes de resistencia.

2.8.4 Métodos emergentes

Además de los métodos mencionados anteriormente, las técnicas emergentes son muy prometedoras para la caracterización y el análisis de compuestos antimicrobianos (Hossain,

2024). Dentro de estas pruebas destacan microcalorimetría isotérmica, el diagnóstico basado en microfluídica, y MALDI-TOF, que obedece a las siglas Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight o ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo.

La microcalorimetría isotérmica (IMC) es una técnica de laboratorio sensible en tiempo real para identificar bacterias en la fase de crecimiento en virtud de la detección de la actividad metabólica que involucra procesos físicos o químicos mediante la medición del flujo de calor. Al utilizar la IMC en tiempo real, se puede medir la tasa de flujo de calor de una bacteria dada en suspensión en presencia de un agente antimicrobiano para monitorear la viabilidad que, a su vez, determina su concentración inhibitoria mínima (Salam et al., 2023).

Por otro lado, la microfluídica ha surgido como una tecnología novedosa y prometedora en la investigación biológica que explota fluidos en un volumen ultrabajo. Este sistema de laboratorio en un chip biomédico se basa en microcanales, en los que se puede administrar un volumen extremadamente pequeño de reactivo, confinando el crecimiento bacteriano a nivel de una sola célula. Los métodos de detección dependen del dispositivo utilizado y varían ampliamente, generalmente son electroquímicos, magnéticos u ópticos/microcalorimétricos (Benkova et al., 2020).

Di Conza (2022) refiere que la ionización-desorción asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) permite la identificación de microorganismos mediante el análisis comparativo de sus perfiles de proteínas, principalmente ribosomales, contra los perfiles correspondientes a cepas de referencia, disponibles en bases de datos o bibliotecas de espectros de masas y específicos para cada género y especie. Además, esta técnica se ha utilizado con éxito para detectar mecanismos de resistencia específicos, por ejemplo, la actividad de enzimas inactivadoras de antibióticos, cuantificando las actividades enzimáticas (Benkova et al., 2020).

2.9 Potencial biotecnológico de las bacteriocinas

La biotecnología emplea sistemas biológicos, organismos vivos o sus derivados para desarrollar productos benéficos para el ser humano (AL-Eitan y Alnemri, 2022). En este contexto, las bacterias ácido lácticas y los compuestos que producen, tienen un amplio potencial biotecnológico debido a sus propiedades probióticas, eficacia antimicrobiana y seguridad para el consumo humano (Li y Han, 2018). Entre los compuestos producidos por las bacterias ácido lácticas destacan las bacteriocinas, las cuales se caracterizan por tener una actividad

antimicrobiana contra varias bacterias patógenas y no patógenas, además de mostrar otras actividades biológicas prometedoras (Daba y Elkhateeb, 2024).

2.9.1 Aplicaciones en la industria alimentaria

En lo que respecta al sector de la biotecnología alimentaria, tanto las bacterias productoras de bacteriocinas como la bacteriocina en sí pueden utilizarse como bioconservantes naturales para prolongar la vida útil de los alimentos. Liang et al. (2025) mencionan que las bacteriocinas se emplean principalmente de tres formas: se utilizan las bacterias productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores para facilitar el proceso de fermentación, se aplican directamente como conservantes de alimentos y se incorporan en los envases o recubrimientos de los alimentos.

Algunas bacteriocinas ya están disponibles comercialmente, por ejemplo, la nisina y la pediocina PA-1 se comercializaron como Nisaplin y Alta2341 (Maïwore y Ngang, 2023).

2.9.2 Aplicaciones en la farmacéutica

Respecto a las aplicaciones que pueden tener estas biomoléculas, es de suma importancia destacar su potencial biotecnológico en el cuidado de la salud, a la hora de combatir microorganismos con una toxicidad relativamente baja en comparación con los antibióticos habituales. Según Solis-Balandra et al. (2024) algunos de los potenciales usos son los siguientes:

El primer uso que se le puede dar a las bacteriocinas, es el uso medicinal como terapias antibióticas contra microorganismos que no son susceptibles a los antibióticos actuales, ya que han demostrado ser efectivas en la eliminación y/o inhibición del crecimiento de cepas resistentes de microorganismos como *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Enterobacter* spp.

Además, las bacteriocinas tienen un potencial significativo para mejorar la microbiota intestinal, debido a que ayudan a que las bacterias ácido lácticas que las producen tengan más potencial para inhibir selectivamente las bacterias dañinas al tiempo que promueven el crecimiento de especies beneficiosas. Esta interacción ayuda a mantener o restablecer el equilibrio microbiano intestinal, lo que hace que las bacteriocinas producidas por BAL sean una herramienta valiosa en el manejo de la salud intestinal (Liang et al., 2025).

Otro de los principales campos en los que las bacteriocinas podrían aplicarse es en las terapias contra el cáncer. La investigación en esta área ha demostrado que las bacteriocinas inhiben la síntesis de ADN y proteínas de membrana, lo que provoca apoptosis o citotoxicidad en las células tumorales (Negash y Tsehai, 2020).

De igual manera, se ha demostrado que las bacteriocinas son agentes espermicidas potenciales debido a su capacidad de afectar la motilidad de los espermatozoides. Negash y Tsehai (2020) describen que la fermenticina HV6b es un péptido antimicrobiano de clase IIa producido por *Lactobacillus fermentum* HV6b MTCC 10770 aislado del ecosistema vaginal humano. Puede inhibir el crecimiento de bacterias, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus*, *Staphylococcus* spp. y *Streptococcus* spp., que causan infecciones vaginales en humanos. Además, la fermenticina HV6b tiene una inmovilización de espermatozoides y una actividad espermicida únicas.

Las bacteriocinas también poseen un gran potencial en el ámbito del cuidado de la piel y el cuidado bucal. ESL5, una bacteriocina producida por *E. faecalis*, reduce significativamente las lesiones inflamatorias como las pústulas. Mientras que la macedocina producida a partir de *S. macedonicus* ACA-DC198 es capaz de matar patógenos bucales en la fase de latencia (Maiwore y Ngang, 2023).

2.9.3 Aplicaciones en la agricultura y veterinaria

De acuerdo con Contessa et al. (2025), las bacteriocinas también tienen potencial para aplicaciones agrícolas, ya que existe la necesidad de reducir los efectos negativos de los fertilizantes químicos, herbicidas y pesticidas en el medio ambiente. En este contexto, las bacteriocinas pueden desempeñar un papel en la lucha contra los patógenos, promoviendo la salud de las plantas y asegurando la calidad ambiental.

Algunos ejemplos de bacteriocinas utilizadas contra fitopatógenos son la agrocina 84 y la turicina 17. La agrocina 84 es producida por *Agrobacterium radiobacter* K84 y es útil para matar *Agrobacterium tumefaciens*, el agente causal de la enfermedad de la agalla de la corona en las plantas. La cepa NCPPB2355 de *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* produce una bacteriocina inhibidora contra *P. syringae* subsp. *savastanoi*, el agente causal de la enfermedad del nudo del olivo. Otras bacteriocinas importantes son las producidas por el género *Pseudomonas* y *Bacillus*. Estas bacteriocinas inhiben uno de los principales hongos fitopatógenos, el *Fusarium*, que puede infectar diferentes tipos de plantas, entre ellas el apio, la cebolla, el repollo, el plátano, el pepino, el tomate, la berenjena, el melón, la sandía, la espinaca, entre otros (Cesa-Luna et al., 2021).

En el campo de la agricultura, las bacteriocinas también han demostrado potencial para actuar como bioestimulantes, favoreciendo el crecimiento de las plantas. Hasta el momento, solo las bacteriocinas de *Bacillus* spp. han sido ampliamente estudiadas y utilizadas. Las bacteriocinas bacturicina F4 y turicina 17 son producidas por diferentes cepas de *B. thuringiensis*, especialmente *B. thuringiensis* BF4 y NEB17. Se ha informado que estas bacteriocinas, junto con

la bacteriocina C85 secretada por *B. cereus* UW85, poseen propiedades de promoción del crecimiento en plantas. La aplicación de un cóctel que contiene la combinación de las 3 bacteriocinas y sus cepas productoras aumentó la fotosíntesis en un 6%, el peso seco de la planta en un 15%, la nodulación de la raíz en un 21% y el área foliar en plantas de maíz, soja y tomate en comparación con los controles (Reuben y Torres, 2024).

En el área de medicina veterinaria, las bacteriocinas surgen como un buen complemento a la terapia antibiótica convencional. En un estudio realizado a caballos, se administró Enterocin M, producida por *Enterococcus faecium* y mostró una reducción significativa de *Clostridium* spp., coliformes y *Campylobacter* spp., a través de exámenes de heces (Contessa et al., 2025).

Por otra parte, el uso de nisina como medicina preventiva y como remedio para la mastitis en el ganado también se ha investigado en la industria veterinaria. Se ha informado que los medicamentos inyectables a base de nisina controlan casi el 99,9% de las bacterias que causan mastitis, como *S. aureus* y *S. agalactiae* después de la administración del medicamento (Maiwore y Ngang, 2023).

2.10 Parámetros cinéticos de crecimiento y consumo en procesos de fermentación

Los parámetros cinéticos son herramientas útiles en el diseño y control de procesos biotecnológicos para obtener un mejor conocimiento del comportamiento del crecimiento microbiano, mediante modelos matemáticos, junto con experimentos detallados, especialmente precisos y repetibles (Rezvani et al., 2017). Estos parámetros proporcionan información clave sobre la tasa de crecimiento microbiano, el consumo de sustrato y la formación de productos de interés (Vera-Peña et al., 2022).

Algunos modelos utilizados para describir el crecimiento microbiano son: el modelo de Monod y el modelo de Contois.

El modelo de Monod es uno de los más utilizados para describir el crecimiento microbiano en función de la concentración de sustrato. Establece que la tasa de crecimiento específica (μ) aumenta con la concentración de sustrato (S) hasta alcanzar un valor máximo (μ_{max}), según la siguiente ecuación:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s + S}$$

Donde μ_{max} es tasa máxima de crecimiento bacteriano, S concentración de sustrato, K_s constante de saturación media y μ tasa de crecimiento bacteriano específico.

Este modelo asume que el sustrato es el único factor limitante, lo que lo hace ideal para procesos en condiciones bien controladas (Muloiwa et al., 2020).

Por otro lado, el modelo de Contois modifica el planteamiento del modelo de Monod al incluir la concentración de biomasa en el denominador de la ecuación, reconociendo que el crecimiento también puede estar limitado por la biomasa misma, especialmente en medios con alta densidad celular (Muloiwa et al., 2020). Su ecuación es la siguiente:

$$\mu = \frac{\mu_{max} S}{K_s X + S}$$

Donde μ_{max} es tasa máxima de crecimiento bacteriano, S concentración de sustrato, K_s constante de saturación media, μ tasa de crecimiento bacteriano específico y X concentración de biomasa.

Una herramienta adicional para comprender la relación entre el crecimiento microbiano y el consumo de sustrato en procesos fermentativos es la ecuación de Pirt. Este modelo fue propuesto por Pirt (1965) y describe el consumo específico de sustrato como la suma de dos componentes: uno asociado al crecimiento celular y otro al mantenimiento celular. La ecuación se expresa como:

$$q_s = m_s + \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

Donde q_s es la tasa específica de consumo de sustrato (g sustrato/g biomasa·h), μ es la tasa específica de crecimiento (h^{-1}), $Y_{x/s}$ es el rendimiento de biomasa por unidad de sustrato consumido (g biomasa/g sustrato) y m_s es el coeficiente de mantenimiento (g sustrato/g biomasa·h). Esta ecuación permite estimar cuánta cantidad de sustrato es utilizada no solo para la producción de biomasa, sino también para satisfacer las necesidades energéticas básicas de la célula cuando no está creciendo. Por ello, la ecuación de Pirt es fundamental para evaluar la eficiencia de conversión de sustrato en condiciones industriales y para optimizar estrategias de alimentación en cultivos continuos o en biorreactores (Van Bodegom, 2007).

III. OBJETIVOS

3.1 General

Aislar y caracterizar una cepa nativa presente en el pulque, utilizando técnicas microbiológicas y moleculares, para estimar su actividad antibacteriana

3.2 Específicos

- I. Aislar cepas de bacterias ácido lácticas nativas del pulque en un tinacal del municipio de Singuilucan Hidalgo
- II. Obtener extractos extracelulares a través de una fermentación a nivel matraz utilizando medio MRS como medio de cultivo.
- III. Evaluar la actividad antimicrobiana de extractos extracelulares obtenidos ante *Listeria monocytogenes* mediante ensayos de difusión en agar por gota.
- IV. Determinar la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos producidos por la bacteria aislada por tratamientos enzimáticos con proteasa
- V. Caracterizar la bacteria ácido láctica proveniente del pulque a través de técnicas moleculares
- VI. Estimar los parámetros cinéticos del crecimiento de la cepa seleccionada proveniente del pulque utilizando el modelo de Monod.

IV. HIPÓTESIS

Existen bacterias ácido lácticas nativas en el pulque, con capacidad de generar compuestos bioactivos antimicrobianos, que presentan actividad inhibitoria frente a microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*.

V. JUSTIFICACIÓN

La biotecnología se refiere al uso de la ciencia para utilizar organismos vivos o sus productos en beneficios para el ser humano (AL-Eitan y Alnemri, 2022).

En este contexto, el aislamiento y caracterización de bacterias nativas del pulque adquiere una gran relevancia debido a que el pulque es una bebida fermentada tradicional mexicana con una microbiota diversa, representando una fuente de microorganismos con un alto potencial biotecnológico (Medina-Mendoza et al., 2023). Entre los microorganismos presentes en el pulque se encuentran las bacterias ácido lácticas, que se destacan por sintetizar pequeñas proteínas llamadas bacteriocinas (Ayivi et al., 2020). Estas, han demostrado poseer un amplio espectro de actividad antimicrobiana, lo que les confiere un gran potencial en diversas áreas, incluyendo la industria alimentaria, farmacéutica, médica y en la agricultura (Maiwore y Ngang, 2023).

Por esta razón, a través de herramientas biotecnológicas, este proyecto busca el aprovechamiento de microorganismos provenientes de fuentes naturales para la obtención de productos con beneficios potenciales para el ser humano.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Sitio de muestreo

La toma de muestras se realizó en el “Tinacal San Cristóbal” (Figura 7) ubicado en la localidad San Cristóbal El Chico, municipio de Singuilucan, estado de Hidalgo, México (19° 59' 7.974" N 98° 34' 44.704" O).

Según datos de INEGI (2010), el municipio de Singuilucan se caracteriza por tener un clima subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media (41.55%), semifrío subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (18.97%), templado subhúmedo con lluvias en verano, de menor humedad (17.47%), templado subhúmedo con lluvias en verano, de mayor humedad (12.48%) y semiseco templado (9.53%). Tiene una temperatura media anual de 10 a 16 °C, con un rango de precipitación 400 a 1100 mm.



Figura 7. Imagen satelital del sitio de muestreo. Google. (2025). Captura de pantalla de la ubicación del tinacal en Singuilucan, Hidalgo. Google Maps. <https://www.google.com/maps>

6.2 Material biológico

Las muestras de microorganismos se aislaron en el área del tinacal. Previamente, se prepararon las soluciones de trabajo y stock, además cajas Petri con agar MRS (DIBICO 1267-E) para bacterias ácido-lácticas. El procedimiento para preparación y dilución de la muestra, así como

para el aislamiento de bacterias a partir del pulque se llevó a cabo de acuerdo al procedimiento descrito en las normas NOM-110-SSA1-1994 (Secretaría de Salud, 1994a) y NOM-092-SSA1-1994. (Secretaría de Salud, 1994b).

Se tomó un mililitro de cada tina referente a las etapas del proceso de fermentación del pulque (aguamiel, semilla, punta y corrida), en condiciones asépticas se realizaron diluciones seriales hasta 10^{-3} . De estas, se tomó un mililitro y se transfirió a cajas petri con agar MRS, se homogeneizaron por siempre en superficie con 3 perlas de vidrio estériles.

Las cajas Petri inoculadas fueron trasladadas al Instituto de Ciencias Agropecuarias en una hielera para evitar posibles cambios de temperatura que pudieran afectar la calidad de las muestras.

Las cajas Petri fueron incubadas durante 72 horas a 36 °C en una incubadora microbiológica.

6.3 Aislamiento y purificación de cepas

A partir del crecimiento en medio sólido del material biológico inoculado, se seleccionaron colonias con morfologías diferentes y se sembraron en medio sólido estriada en forma de líneas diagonales de 1 cm dentro de una cuadrícula marcada en la caja Petri, de manera que cada bacteria ocupara un solo cuadrado en la cuadrícula, posteriormente, las bacterias se sometieron a las mismas condiciones de incubación planteadas anteriormente, 36°C durante 72 horas.

Para garantizar la pureza de las cepas se realizó la prueba de tinción de Gram, de acuerdo al procedimiento descrito por Rodríguez y Arenas (2018).

6.4 Pruebas bioquímicas preliminares

Uno de los ensayos preliminares utilizados para la selección de cepas fue la prueba de catalasa, que consistió en tomar una pequeña cantidad de cada colonia bacteriana en un portaobjetos, y se agregó sobre esta, una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada). La observación de la liberación de burbujas durante esta interacción indicó que la prueba es positiva, mientras que la ausencia de burbujas se tomó como negativa (Roy et al., 2023).

Otra prueba realizada fue oxidasa, el procedimiento implicó la colocación de una pequeña cantidad de colonia bacteriana sobre papel filtro impregnado con el reactivo de la enzima oxidasa. La detección de un cambio de color, generalmente hacia tonos azules oscuros o púrpuras, indicó que la prueba es positiva. Mientras que, la ausencia de color se consideró negativa (Aslazadeh, 2006).

6.5 Ensayos preliminares de la actividad antimicrobiana

De las cepas puras, se seleccionaron tres de las cuales dieron positiva a tinción de Gram, y negativas a catalasa y oxidasa. Estas se sometieron al ensayo de placa doble capa de acuerdo a la metodología descrita por Zhao et al. (2004) y Cervantes-Elizarrarás et al. (2019) con modificaciones, para confirmar la inhibición del crecimiento de *Listeria monocytogenes*. La bacteria patógena se activó inoculando 5 ml de caldo infusión cerebro corazón (BHI por sus siglas en inglés) estéril (MCD LAB 740) con 500 microlitros de un cultivo proporcionado por el Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez del área académica de MVZ-ICAp. Se incubó durante un periodo de 24 horas a 37 °C.

El primer paso para este ensayo fue cultivar las tres cepas seleccionadas en una caja Petri con agar MRS. La caja Petri se dividió en cuatro secciones y cada cepa se sembró en un área de 1 cm en cada sección. Posteriormente, las cepas se llevaron a incubación durante 72 horas a 36°C.

El segundo paso fue la activación de *L. monocytogenes*. Se inoculó 5 mL de caldo BHI con 500 µL de cultivo y se incubó durante 24 horas a 36°C.

Después del periodo de incubación de la caja Petri con tres cepas seleccionadas, se vertió sobre la placa 20 ml de medio BHI con agar al 0.75% inoculado con 500 µL de cultivo activo de *Listeria monocytogenes*. Al medio BHI también se le agregó CaCO₃ al 0.1% para neutralizar los ácidos orgánicos que producen las bacterias.

Finalmente, la placa con las dos capas se dejó solidificar y se incubó durante 24 horas a 36 °C. El criterio para la selección de la cepa fue que presentara un halo de inhibición.

6.6 Fermentación por lote

6.6.1 Producción de sustancia antimicrobiana extracelular

La sustancia antimicrobiana se obtuvo realizando una fermentación por lote a nivel matraz (Belguesmia et al., 2020). Para activar la BAL seleccionada se tomó con un palillo de madera estéril una pequeña cantidad de colonia, se colocó dentro de un tubo cónico de 50 ml que contenía 5 mL de caldo MRS (Difco 288130) y se incubó durante 20 horas a 36 °C. Después del periodo de incubación, se tomaron 500 µL del cultivo activado para inocular 5 mL de caldo MRS y se incubó nuevamente por 20 horas a 36 °C.

Finalizado el tiempo de incubación, se tomaron muestras del cultivo y se realizaron dos diluciones (10⁻¹ y 10⁻²) para medir el crecimiento bacteriano a través de la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀)

utilizando un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 UV/VIS). Se utilizó agua destilada como blanco. La absorbancia obtenida se multiplicó por su factor de dilución (x10, x100) y se calculó el promedio a partir del resultado de la absorbancia de las dos diluciones.

Posteriormente, se convirtió el promedio de la absorbancia del cultivo a densidad celular (ufc/ml) tomando como base que la absorbancia con valor de 1 equivale a 8×10^8 ucf/ml (Christensen et al., 2007). El inóculo se ajustó a 1×10^7 ufc/ml.

Para la fermentación por lote se utilizó un matraz Erlenmeyer de 250 mL con un volumen de 100 mL de caldo MRS (Difco) estéril, en condiciones de 36°C, sin agitación, durante 32 horas. Para iniciar con la fermentación se inoculó el medio de cultivo con 10×10^7 ufc/mL. Se tomaron muestras de 5 mL a las 0, 2, 4, 6, 8, 10, 22, 24, 26, 28, 30 y 32 horas para evaluar la densidad óptica a 600 nm, concentración de biomasa húmeda (X, g/L), pH, concentración de azúcares y proteínas.

6.6.2 Medición de densidad óptica

Para monitorear la densidad celular se tomaron con puntas estériles 20 µL de cultivo en cada tiempo evaluado y se midió la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 UV/VIS). Como blanco se utilizó caldo MRS estéril.

6.6.3 Concentración de biomasa húmeda

La determinación del peso húmedo de las células se realizó de acuerdo a Godbey (2022). Previamente a la toma de muestras, los tubos cónicos se pesaron con su tapa en una balanza para conocer el peso del tubo vacío.

Al finalizar la fermentación, las muestras de 5 mL de cada tiempo evaluado fueron centrifugadas a 4,000 rpm a 4°C durante 30 minutos. El sobrenadante libre de células se colectó en tubos cónicos de 15 mL estériles, mientras que los tubos con el pellet de biomasa fueron pesados en una balanza.

Para calcular la biomasa se utilizó la siguiente ecuación:

$$X = \frac{P_{t+x} - P_t}{V_m}$$

Donde X es la concentración de biomasa (g/L), P_t es el peso del tubo (g), P_{t+x} es el peso del tubo más biomasa (g) y V_m el volumen de la muestra (L).

6.6.4 Medición de pH

Una vez obtenido el sobrenadante libre de células, se midió el pH de las muestras de cada tiempo evaluado utilizando un potenciómetro (Hanna Hi 2211).

6.6.5 Determinación de azúcares reductores totales

La concentración de carbohidratos en el sobrenadante a lo largo de la fermentación se determinó por el método colorimétrico DNS (Miller, 1959). Para cuantificar los azúcares reductores en cada muestra se tomaron 5 mL de caldo en diferentes tiempos. La muestra se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente el sobrenadante fue separado del pellet de biomasa y almacenado en congelación para su posterior análisis. El sobrenadante se descongeló y se hizo una dilución 1:40 para determinar los azúcares presentes en cada muestra.

Para preparar el reactivo DNS se pesaron 1 gramo de ácido dinitrosalicílico (DNS) y 30 gramos de tartrato de sodio y potasio, estos se añadieron a 80 mL de NaOH 0.5 N. La solución se calentó lentamente hasta disolver y se aforó a 100 mL con agua destilada. El reactivo se almacenó en un frasco con tapa de rosca color ámbar para protección de la luz.

Para realizar la curva patrón se preparó 100 mL de una solución patrón de glucosa (1g/L) y se realizaron diluciones a concentraciones conocidas que fueron de 0 a 1 g/L. Se tomó 1 mL de cada concentración y 1 mL de reactivo DNS y se colocaron en tubos de cultivo de 10 mL, posteriormente se agitaron y se calentaron en un baño de agua en ebullición durante 5 minutos. Enseguida se enfrió con agua corriente y se adicionaron 8 mL de agua destilada a cada tubo, finalmente se agitó y se leyó la densidad óptica a 575 nm en un espectrofotómetro previamente calibrado con el blanco.

6.6.6 Determinación de proteína

La concentración de proteína se determinó por el método directo A280 descrito en Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers (2010).

Se tomaron 2 µL de sobrenadante libre de células de cada tiempo obtenido y se colocaron directamente en el espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 UV/VIS).

6.7 Actividad antimicrobiana

6.7.1 Concentración de la actividad antimicrobiana

Los 5 mL del sobrenadante obtenido de cada tiempo evaluado se dividieron en dos para realizar dos tratamientos diferentes. El primer tratamiento consistió en ajustar el pH a 6.8 con NaOH 0.1 N con el fin de evitar la interferencia de ácidos orgánicos en la evaluación antimicrobiana contra

Listeria monocytogenes (Sánchez Reyes, 2014). En el segundo tratamiento no se realizó ningún ajuste de pH.

Posteriormente se tomó 1 mL de cada sobrenadante de cada tiempo (con pH ajustado y sin ajustar), se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se concentró en un baño seco a 100°C durante 60 minutos, hasta obtener un volumen final de 250 µL aproximadamente. Finalmente, el concentrado se conservó en refrigeración hasta su uso.

6.7.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes se utilizó el método de difusión en agar por gota, utilizando gotas del sobrenadante. Este ensayo también es conocido como spot-on-law y es utilizado para la determinación de la actividad antimicrobiana de los probióticos contra patógenos (Fijan, 2016).

En esta técnica también se evaluaron tratamientos diferentes, un tratamiento se realizó utilizando cajas con agar BHI adicionado CaCO₃ al 0.1% para neutralizar los ácidos orgánicos que producen las bacterias (Yang et al., 2025), mientras que en otro tratamiento no se utilizó CaCO₃.

Al combinar las condiciones del sobrenadante y el medio de cultivo, se evaluaron un total de cuatro tratamientos: sobrenadante sin ajuste de pH + agar sin CaCO₃, sobrenadante con ajuste de pH + agar sin CaCO₃, sobrenadante sin ajuste de pH + agar con CaCO₃, sobrenadante con ajuste de pH + agar con CaCO₃.

Como microorganismo indicador de la actividad antimicrobiana se utilizó *Listeria monocytogenes*. La activación de esta bacteria se realizó inoculando 500 µL en 5 mL de BHI estéril e incubando a 36 °C por 24 horas.

Posteriormente, dentro de una campana de flujo laminar, se tomó el cultivo activo de *Listeria monocytogenes* y se inoculó con un hisopo estéril la superficie completa del agar BHI. Se esperó a que la superficie del agar quedará completamente seca y se procedió a colocar 10 µL de cada extracto concentrado. Las cajas Petri con *Listeria* y el extracto se llevaron a incubación a 36 °C durante 24 horas.

6.7.3 Efecto de proteasas sobre la actividad antimicrobiana

Con el fin de confirmar la naturaleza proteica de las sustancias con actividad antimicrobiana e identificarlas como bacteriocinas, se evaluó el efecto de una proteasa sobre la actividad antilisteria del sobrenadante concentrado utilizando el procedimiento descrito por Sánchez (2014)

con algunas modificaciones. Para ello se preparó una solución de proteasa (Qiagen) de 1 mg/mL y en un tubo Eppendorf se colocaron 10 µL de esta solución con 10 µL de sobrenadante concentrado con actividad antilisteria, posteriormente se incubó a 36 °C por 2 horas.

Pasado el tiempo de incubación se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* mediante la prueba difusión en agar descrita anteriormente.

Se incluyó un control negativo (sobrenadante concentrado sin tratamiento con proteasa) y un control positivo (solución de proteasa 1 mg/mL + agua destilada).

6.8 Identificación molecular de la bacteria productora de compuestos antimicrobianos

6.8.1 Extracción de ADN

El ADN se obtuvo mediante la metodología descrita por Martín-Platero et al. (2007) con algunas modificaciones.

Se tomó un 1 mL de cultivo de bacteria ácido láctica con 72 horas de incubación, se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó durante 10 minutos a 14500 rpm. Posteriormente se desechó el sobrenadante y al pellet se le hicieron tres lavados que consistieron en agregar agua destilada, agitar en el vortex, centrifugar a 5 min a 14500 rpm y desechar el sobrenadante.

El pellet obtenido después de realizar los lavados se resuspendió en una solución que contenía 100 µL de buffer TES (sacarosa 10%, TRIS-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM), 100 µL de lisozima 10 mg/mL y 20 µL de RNAsa (Invitrogen). Se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionaron 600 µL de buffer lisis (TRIS-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 100 mM, NaCl 10 mM, SDS 1%), se mezcló suavemente y se dejó reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Pasando los 15 minutos de reposo, se agregó 10 µL de proteinasa K (Roche®) y se incubó durante 15 minutos a 50 °C en un termobloque. Posteriormente se enfrió a temperatura ambiente, se adicionaron 200 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2, se enfrió en el congelador durante 15 minutos y se centrifugó a 14500 rpm durante 10 minutos para recuperar el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido se dividió en dos partes y cada parte se colocó en tubos Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se adicionaron 600 µL de isopropanol, se agitaron cuidadosamente y se llevaron al congelador durante toda la noche. Después, los tubos se centrifugaron a 14500 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante.

A los tubos con el pellet se les adicionaron 600 μ L de etanol al 70% y se centrifugó nuevamente a 14500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y el pellet en los tubos se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, se les agregó 50 μ L de buffer TE (TRIS- HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8) para resuspender el ADN.

Finalmente, se cuantificó el ADN en un espectrofotómetro (Thermo Scientific™ NanoDrop™ 1000 UV/VIS).

De acuerdo al Manual de uso de NanoDrop One de Thermo Scientific (2016), una relación de pureza A260/A280 de \sim 1,8 se acepta generalmente como óptima para el ADN. Mientras que el valor óptimo de A260/A230 se encuentra en un rango de 1.8 a 2.2 para ADN.

6.8.2 PCR gen 16S ARNr bacteriano

La amplificación del gen 16S rRNA de la colonia seleccionada se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa), siguiendo el protocolo descrito por Zepeda-Velázquez et al. (2023).

Los primers que se utilizaron para la amplificación del gen ARNr 16S fueron los siguientes (Borrell et al., 1997):

27F: 5'– AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG –3'

1492R: 5'– TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T -3'

Para la mezcla para una reacción de PCR se utilizaron 32.15 μ L de Agua libre de RNA, 10 μ L de Taq Buffer, 4 μ L de $MgCl_2$, 1 μ L de dNTP mix, 0.8 μ L de Forward Primer (10 μ M), 0.8 μ L de Reverse Primer (10 μ M) y 0.25 μ L de Taq DNA Polimerasa (GoTaq® Flexi DNA Polymerase Promega).

Se preparó una mezcla de reacción para la muestra de ADN obtenidas, sin agregar el ADN. Posteriormente, se transfirió 49 μ L de la mezcla correspondiente a una reacción a microtubos para PCR y se agregó 1 μ L del ADN de estudio. Para llevar a cabo la reacción de PCR se utilizó el termociclador Mastercycle Egradient Modelo 5341 (Eppendorf, Hamburg, Alemania), el cual es un equipo especializado para proveer las condiciones necesarias para la reacción. Las condiciones para la amplificación del gen ARNr 16S fueron las siguientes: desnaturalización inicial, 95 °C durante 3 min; amplificación, 94 °C por 1 min, seguido de 56 °C por 1 min y 72 °C por 2 min repitiendo este ciclo 35 veces; amplificación final, 72 °C durante 10 min.

El producto final de la amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis, visualizándolo en el fotodocumentador Gel Logic 1500 Imaging System, utilizando el software Carestream MI SE versión 5.4.2.

6.8.3 Purificación del amplificado

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo utilizando el kit de purificación Wizard™ SV Gel and PCR Cleanup System (Promega).

Después de correr el gel de agarosa al 1%, se cortó y se pesó la banda correspondiente al producto amplificado de la PCR. Posteriormente, se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL de capacidad y se agregaron 10 µL de Membrane Binding Solution por cada 10 mg de muestra. Se agitó en el vortex y se incubó a 60 °C en un termobloque (Benchmark scientific) hasta que se disolvió el gel. El líquido se transfirió a una minicolumna de sílice Wizard™ SV ensamblada sobre un tubo colector. Enseguida se incubó a un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó durante un minuto a 14500 rpm. Se desechó lo que quedó en el tubo colector y se volvió a ensamblar. Posterior a eso, se agregaron 700 µL de Membrane Wash Solution, se volvió a centrifugar durante un minuto a 14500 rpm y se desechó lo que quedó en el tubo colector. Se colocaron 500 µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó de nuevo a 14500 pero ahora durante 5 minutos. Se volvió a desechar lo que quedó en el tubo colector y enseguida se centrifugó durante un minuto a 14500 rpm. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf limpio, se agregaron 50 µL de agua libre de nucleasas y se incubó a temperatura ambiente durante un minuto. Después de la incubación, se centrifugó y se desechó la columna de sílice.

La cuantificación de la cantidad de ADN purificado se realizó utilizando el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. El equipo se calibró con 2 µL de agua libre de nucleasas. Posterior a la calibración, se depositaron 2 µL del producto de PCR purificado para su cuantificación.

6.8.4 Secuenciación de gen

La secuenciación del gen ARNr 16S se realizó en Laboratorio de Servicios Genómicos del LANGEBIO (Irapuato, Guanajuato). Para cada muestra de ADN se obtuvieron dos secuencias (forward y reverse), las cuales se alinearon con el software Mega (versión 11.0.13). A partir del alineamiento, se obtuvo la secuencia completa del gen de la cepa que se utilizó para su identificación genética.

6.8.5 Identificación genética

Las secuencias obtenidas se compararon con las bases de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el uso del programa online Blast (refseq) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

6.9 Análisis Estadístico

Se corroboró la normalidad de los resultados utilizando la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, para corroborar la interacción entre los factores, se dispuso un diseño experimental analítico por bloques, para posteriormente realizar pruebas de ANOVA de una vía, así como de medidas repetidas, según aplique de acuerdo a la naturaleza de los datos. Finalmente se realizó la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey para corroborar diferencias significativas entre los tratamientos y las observaciones.

Para describir el crecimiento microbiano se utilizó el modelo de Monod, el cual permitió estimar la velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{m\acute{a}x}$), la constante de saturación (K_s) y la velocidad específica de crecimiento (μ). Este modelo se expresa mediante la ecuación:

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S}$$

Donde μ corresponde a velocidad específica de crecimiento, $\mu_{m\acute{a}x}$ representa la velocidad máxima de crecimiento específico, S la concentración de sustrato disponible y K_s la constante de saturación del sustrato.

En cuanto al consumo de sustrato, este se determinó usando el modelo de Aborthey-Williamson o Pirt (Mazzeo y Piemonte, 2019; Pirt, 1965), definido por la siguiente ecuación:

$$qs = ms + \frac{\mu}{Y_{x/s}}$$

Donde qs es el consumo de sustrato ms es la velocidad de consumo de sustrato para el mantenimiento celular basal, μ es la velocidad específica de crecimiento y $Y_{x/s}$ es el rendimiento de biomasa.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Selección de bacteria

Se aislaron un total de 25 colonias bacterianas provenientes de distintas etapas del proceso de fermentación del pulque. De estas, 23 cumplieron con las características de ser catalasa negativa, oxidasa negativa y Gram positivas, atributos que, según Lahmamsi et al. (2024), son propios de las bacterias ácido lácticas (BAL), un grupo microbiano característico del pulque y que contribuye a que esta bebida sea considerada un producto con potencial probiótico Rodríguez-Juárez et al., 2021).

A partir de este grupo, se seleccionaron aleatoriamente tres cepas con morfología microscópica diferente para llevar a cabo ensayos preliminares de actividad antimicrobiana. Las tres cepas seleccionadas demostraron actividad frente a *Listeria monocytogenes* en el ensayo de doble capa. De acuerdo con Cervantes-Elizarrarás et al. (2019), los microorganismos probióticos, como las BAL, pueden actuar como barrera natural contra patógenos como *L. monocytogenes*.

No obstante, solo una de las cepas fue seleccionada para los ensayos posteriores, también mediante elección aleatoria. Esta cepa se caracterizó por presentar una morfología de bacilos largos y delgados (Figura 8), con pequeñas colonias circulares de color blanco y consistencia cremosa. Cabe destacar que esta bacteria fue aislada de la etapa final del proceso de fermentación del pulque.

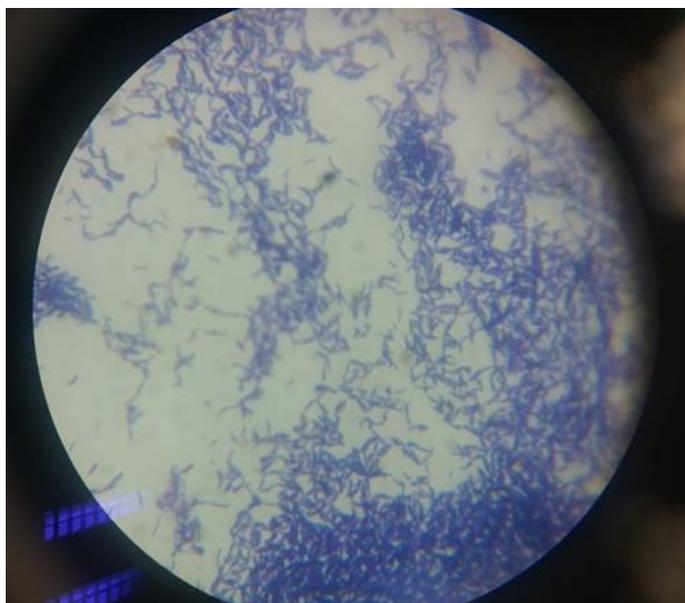


Figura 8. Tinción de Gram de la cepa seleccionada (100x) bacilos Gram positivos. Fuente: Elaboración propia.

7.2 Actividad antimicrobiana

7.2.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes, se utilizó el método de difusión en agar adaptado para utilizar gotas del sobrenadante libre de células en lugar de usar discos impregnados. La actividad antimicrobiana se determinó observando la zona de inhibición y midiendo su diámetro en milímetros.

Se aplicaron dos tratamientos en las placas de agar. En el primer tratamiento, se utilizó agar BHI suplementado con 0.1% de CaCO_3 para neutralizar los ácidos orgánicos producidos por las bacterias, mientras que, en el segundo tratamiento, no se añadió CaCO_3 .

Simultáneamente, el sobrenadante libre de células también se sometió a dos condiciones: en una se ajustó el pH a 6.8 y en la otra no se realizó ajuste de pH.

Al combinar las condiciones del sobrenadante y el medio de cultivo, se evaluaron un total de cuatro tratamientos: sobrenadante sin ajuste de pH + agar sin CaCO_3 , sobrenadante con ajuste de pH + agar sin CaCO_3 , sobrenadante sin ajuste de pH + agar con CaCO_3 , sobrenadante con ajuste de pH + agar con CaCO_3 . Los resultados se muestran en la tabla 2:

Tabla 2. Efecto del ajuste de pH y la presencia de CaCO_3 en el medio de cultivo sobre la actividad antimicrobiana del sobrenadante.

No. Tratamiento	Detalles del tratamiento	Diámetro de la zona de inhibición (mm)
I	Sin ajuste de pH al sobrenadante + sin CaCO_3 en el medio de cultivo	7.3 ^a
II	Con ajuste de pH al sobrenadante + sin CaCO_3	-
III	Sin ajuste de pH al sobrenadante + con CaCO_3 en el medio de cultivo	6.583 ^b
IV	Con ajuste de pH al sobrenadante + con CaCO_3 en el medio de cultivo	-

Diferentes letras en la última columna significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$). (-) Sin inhibición. Fuente: Elaboración propia.

El tratamiento en donde se obtuvo significativamente una mayor actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes* fue en el tratamiento I con halos de inhibición de 7.3 mm. Este hallazgo sugiere que los compuestos antimicrobianos presentes en el sobrenadante son más efectivos en condiciones de pH ácido y en ausencia de agentes neutralizantes como el CaCO_3 .

Por otro lado, el tratamiento de III también presentó actividad antimicrobiana, sin embargo, fue significativamente menor con halos de inhibición de 6.5 mm en promedio. Esto indica que la presencia de CaCO_3 , al neutralizar los ácidos orgánicos producidos por las bacterias, reduce parcialmente la efectividad del compuesto antimicrobiano. Arriola-Bretón et al. (2020) refieren que el principal efecto antimicrobiano de las bacterias ácido lácticas se produce mediante la producción de diferentes ácidos orgánicos.

En los tratamientos II y IV donde el sobrenadante se ajustó a un pH de 6.8 no se observaron halos de inhibición, lo que sugiere que los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana son inestables o pierden eficacia en condiciones de pH elevado.

Este comportamiento es consistente con estudios previos, como el de Wang et al. (2020), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de sobrenadantes libres de células producidos por diversas

cepas de bacterias ácido lácticas. En su estudio, se observó que el potencial antimicrobiano del sobrenadante disminuye a medida que aumentaba el pH, y que a un pH de 6 no se detectaba actividad antibacteriana. Asimismo, Ju et al. (2021) evaluaron el efecto antibacteriano de sobrenadantes libres de células producidos por *Lactobacillus paracasei* contra *Alicyclobacillus acidoterrestris* y los resultados indicaron que el pH influyó considerablemente la actividad antibacteriana. Los resultados indicaron que la actividad antibacteriana fue estable entre pH 3 y 4, pero disminuyó cuando el pH aumentó a 5, debido a las acciones de los ácidos orgánicos u otras sustancias antibacterianas dependientes del pH en el caldo de fermentación, sin embargo, cuando el pH aumentó a 6-7 el diámetro del círculo bacteriostático aumentó, lo que puede atribuirse a una acidez débil o un entorno neutro, que no es propicio para el crecimiento de *A. acidoterrestris*. En otra investigación realizada por Jiang et al. (2022) trabajaron con una bacteriocina producida por *Lactobacillus paracasei* y demostraron que hubo una fuerte actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en valores de pH de 2 a 6, mientras que en valores de pH de 8 a 10 su actividad fue significativamente menor, lo que refuerza la idea de que el pH es un factor crítico para la estabilidad y eficacia de los compuestos antimicrobianos.

En este estudio, la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *Lacticaseibacillus paracasei* fue detectada únicamente a partir de las 22 horas de fermentación (figura 9), alcanzando su punto máximo en ese mismo tiempo, con un halo de inhibición promedio de 7.5 mm. Posteriormente, la actividad se mantuvo constante, pero mostró una disminución significativa a las 30 y 32 horas, con halos promedio de 6.5 mm. Esto sugiere que la producción de compuestos antimicrobianos, como bacteriocinas o ácidos orgánicos, es dependiente del tiempo de fermentación y que estos compuestos pueden degradarse o perder eficacia en etapas avanzadas del proceso. Además se ha reportado que la producción de bacteriocinas está estrechamente asociada al crecimiento bacteriano, particularmente durante la fase exponencial. Yang et al. (2018) reportaron que la actividad de las bacteriocinas de cuatro cepas de bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus curvatus*, *Enterococcus faecium*, *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* y *Streptococcus thermophilus*) aumentó de forma continua durante la fase exponencial, alcanzando niveles máximos al final de esta fase. De manera similar, Pei et al. (2013) señalaron que la producción máxima de paracina C se alcanzó después de 20 horas de cultivo, coincidiendo con el inicio de la fase estacionaria, aunque su actividad ya era detectable desde el comienzo de la fase exponencial. Por su parte, Iseppi et al. (2019) observaron que la cepa *L. paracasei* ssp. *paracasei* LP5 comenzó a producir bacteriocina BacLP5 a las 4 horas, durante la fase logarítmica temprana, alcanzando su máxima concentración a las 16 horas y manteniéndose estable hasta las 24 horas.

Estos hallazgos indican que, si bien la síntesis de bacteriocinas puede iniciarse en las primeras etapas del crecimiento, su producción máxima suele coincidir con la fase exponencial tardía o el inicio de la fase estacionaria.

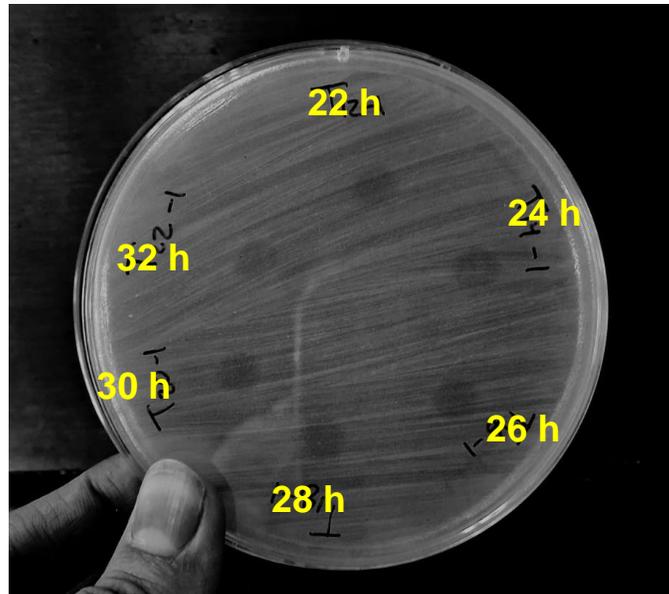


Figura 9. Prueba de actividad antimicrobiana realizada con gotas de sobrenadantes libres de células obtenidos a diferentes horas contra *Listeria monocytogenes*. Fuente: Elaboración propia.

Dinev et al. (2022) evaluaron sobrenadantes obtenidos después de 24 horas de fermentación y reportaron halos de inhibición de 13 a 14 mm contra *Listeria monocytogenes*, valores significativamente mayores que los obtenidos en este estudio. Esto podría deberse a diferencias en las cepas utilizadas, las condiciones de cultivo o el volumen de sobrenadante empleado (100 μ L en su caso). De manera similar, Iseppi et al. (2019) reportaron halos que varían entre más de 5 mm y más de 15 mm dependiendo de la cepa de *L. monocytogenes* utilizada, lo que resalta la variabilidad en la actividad antimicrobiana dependiendo del microorganismo objetivo y las condiciones experimentales.

Por otro lado, Wang et al. (2020) reportaron halos de inhibición de 15 a 20 mm contra *L. monocytogenes* utilizando 200 μ L de sobrenadante, lo que sugiere que el volumen de sobrenadante aplicado también puede influir significativamente en los resultados.

Aunque los halos de inhibición obtenidos en este estudio son menores que los reportados en otras investigaciones, las diferencias en las cepas utilizadas, los microorganismos objetivo, las

condiciones de fermentación y los volúmenes de sobrenadante evaluados podrían explicar estas variaciones.

7.2.2 Efecto de la proteasa sobre la actividad antimicrobiana

Con el fin de determinar la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos presentes en los sobrenadantes, estos fueron sometidos a un tratamiento con proteasa (1 mg/mL) e incubados por 2 horas a 37 °C.

En los sobrenadantes con tratamiento de proteasa se obtuvo una pérdida total de la actividad antimicrobiana, mientras que en los que no se le aplicó ningún tratamiento con proteasa se mantuvo la actividad antimicrobiana (figura 10). Estos resultados sugieren que las sustancias responsables de la actividad antimicrobiana en los sobrenadantes producidos de *Lactocaseibacillus paracasei* son proteínas o péptidos que fueron degradados por la acción enzimática de la proteasa, lo que impidió su efecto contra *Listeria monocytogenes*.

Investigaciones previas han reportado que diversas especies de bacterias ácido lácticas producen bacteriocinas, que son péptidos antimicrobianos con actividad específica contra diversas bacterias (Daba y Elkhateeb, 2024).

El hecho de que los sobrenadantes tratados con proteasa perdieran completamente su actividad indica que los compuestos antimicrobianos no corresponden a metabolitos como ácidos orgánicos o peróxido de hidrógeno, los cuales también son producidos por las bacterias ácido lácticas (Fatima et al., 2023). Esto refuerza la hipótesis de que la actividad antimicrobiana observada es atribuible a bacteriocinas u otros péptidos bioactivos.

Además, coincide con los resultados obtenidos en otros con otros estudios en los que los sobrenadantes libres de células, producidos por cepas ácido lácticas, han sido tratados con enzimas proteolíticas, resultando en la pérdida de su actividad antimicrobiana (Jiang et al., 2022; Wang et al., 2021).

Por otro lado, estudios recientes han demostrado que algunas cepas de *Lactocaseibacillus paracasei* pueden producir bacteriocinas con un amplio espectro de acción contra diversos patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa*, entre otros (Jiang et al., 2022; Ye et al., 2021).

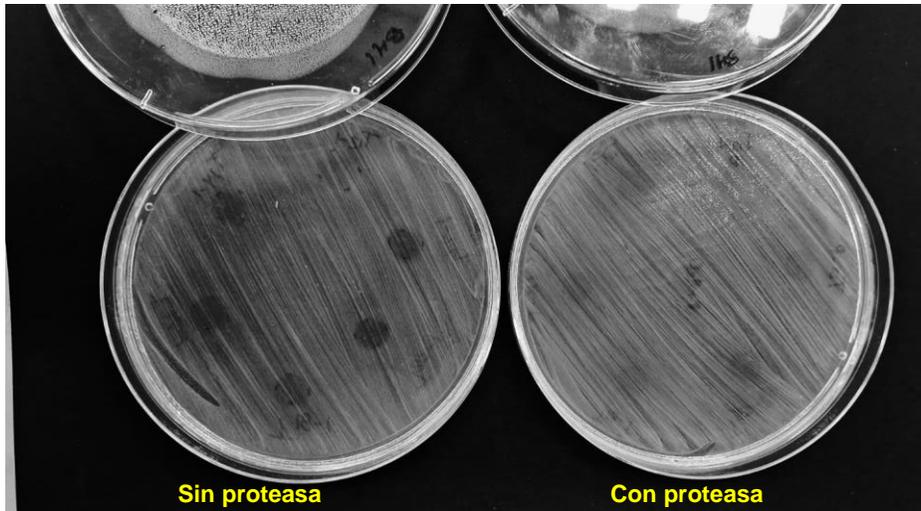


Figura 10. Comparación del efecto de la proteasa en la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes libres de células contra *Listeria monocytogenes*. Fuente: Elaboración propia.

7.3 Identificación molecular de la bacteria productora de compuestos antimicrobianos

7.3.1 Extracción de ADN

La cuantificación del ADN extraído arrojó una concentración de 921 ng/μL, con una relación 260/280 de 1.88 y una relación 260/230 de 1.88 (figura 11). Estos valores indican que la muestra presenta una calidad y pureza óptimas, lo que sugiere una mínima presencia de contaminantes como proteínas, fenoles u otros compuestos que podrían interferir en análisis posteriores.

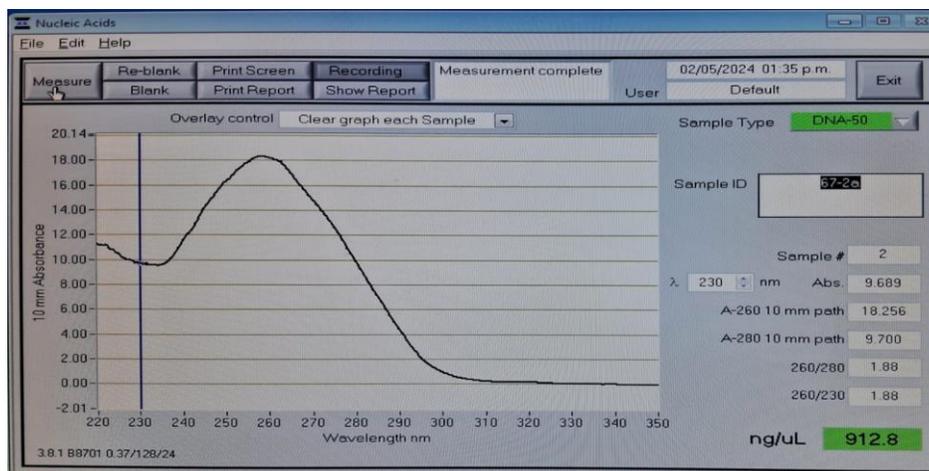


Figura 11. Espectro de absorbancia del ADN extraído. Fuente: Elaboración propia.

7.3.2 PCR gen 16S ARNr bacteriano y purificación del amplificado

El ADN que se obtuvo de la bacteria ácido láctica seleccionada se utilizó para la amplificación del gen ARNr 16S mediante PCR. El producto final de la amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1% en buffer TBE de electroforesis. Se comprobó la amplificación del gen ARNr 16S observando una banda aproximadamente de 1500 pb (figura 12).

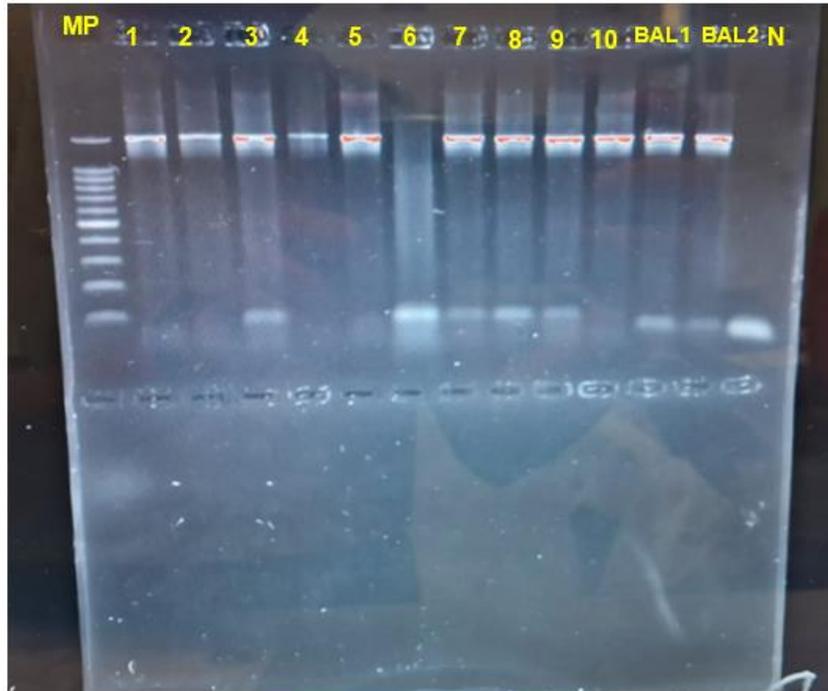


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa: MP indica el marcador de peso molecular, mientras que BAL1 y BAL2 corresponden al amplificado de la bacteria ácido láctica con una repetición, N es el negativo y los carriles con los números del 1 al 10 contienen muestras pertenecientes a otro proyecto con el mismo gen amplificado, correspondientes a otras cepas bacterianas.

Fuente: Elaboración propia.

Como resultado de la purificación, se obtuvo una concentración de ADN de 72.4 ng/μL, una relación de A260/A280 de 1.86 y A260/230 de 2.18, cumpliendo con los valores requeridos por el Laboratorio de Servicios Genómicos UGA- LANGEBIO (Irapuato, Guanajuato).

7.3.3 Identificación genética

Se obtuvieron dos secuencias de buena calidad (forward y reverse) en dos archivos distintos, los cuales se analizaron en los softwares DNASTAR Lasergene SeqMan (versión 7.0.0) y MEGA (versión 11.0.13) para alinear las secuencias y obtener la secuencia consenso. La secuencia consenso se comparó con la base de datos del NCBI utilizando el programa Blast

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Se realizó el árbol filogenético con las cepas tipo y con la cepa aislada en esta investigación.

De acuerdo a la comparación realizada en el BLAST y al análisis filogenético de las secuencias de ARNr 16S (figura 13), se determinó que las secuencias con mayor similitud (99.93%) a la secuencia de la bacteria aislada corresponden a cepas de *Lacticaseibacillus paracasei*.

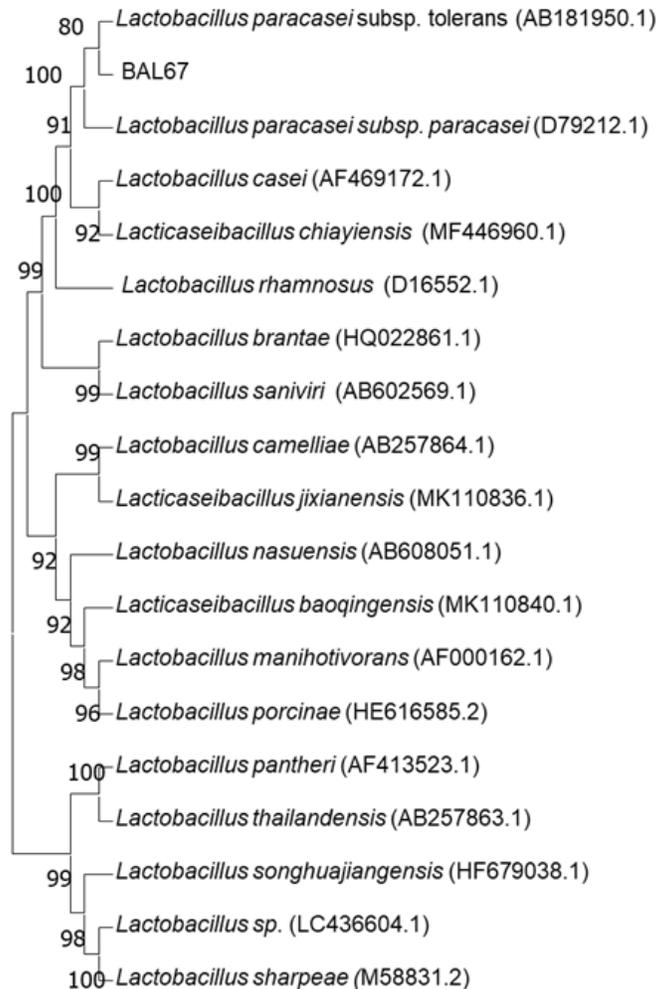


Figura 13. Relación filogenética de la bacteria ácido láctica BAL67 aislada de pulque. Las especies se infieren mediante el análisis Neighbor-joining del gen ARNr 16S, con base en las distancias evolutivas calculadas mediante el modelo de dos parámetros de Kimura. Los números entre paréntesis corresponden a los números de acceso de la secuencia publicada.

Estos resultados coinciden con investigaciones previas en las que *L. paracasei* ha sido identificada a partir de muestras pulque (Ruíz-Ramírez et al., 2022) o de origen similar como el aguamiel (Gallardo-Martínez et al., 2024).

Lacticaseibacillus paracasei es una bacteria que ha sido ampliamente reportada por su potencial probiótico (Chen et al., 2025; Falfán-Cortés et al., 2022) y su capacidad para producir compuestos antimicrobianos (Jiang et al., 2022).

7.4 Cinética de la fermentación por lote

7.4.1 Cinéticas de crecimiento: densidad óptica y producción de biomasa húmeda

Los datos de densidad óptica y biomasa húmeda permiten una evaluación complementaria del crecimiento bacteriano a lo largo del tiempo de fermentación (Madrid y Felice, 2005), mostrando patrones característicos de las fases microbianas. De acuerdo a los análisis estadísticos ambos parámetros presentan diferencias significativas a lo largo del tiempo ($p < 0.05$) (Tabla 3), lo cual confirma que el crecimiento de la cepa sigue un ciclo dinámico semejante al tradicional descrito por Monod (1949) compuesto por las fases de adaptación, crecimiento exponencial, fase estacionaria y muerte celular (Figura 14). A pesar de su antigüedad, este modelo sigue siendo vigente y útil en estudios actuales debido a su simplicidad y capacidad de adaptación a distintos tipos de fermentaciones microbianas (Muloiwa et al., 2020).

Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos obtenidos durante la cinética de fermentación de *Lacticaseibacillus paracasei*.

Tiempo (h)	Densidad óptica (abs)	Biomasa húmeda (g/L)	pH	Concentración de azúcares reductores (g/L)	Concentración de proteína (mg/ml)
0	0.0083 ^d	7.4 ^b	5.9866 ^a	25.7980 ^a	0.4233 ^d
2	0.0133 ^d	6.0666 ^b	5.2033 ^{ab}	21.7790 ^{ab}	0.6116 ^{cd}
4	0.0273 ^{cd}	12.9333 ^{ab}	4.79 ^{bc}	16.5028 ^{bc}	0.72 ^{bcd}
6	0.1436 ^{ab}	18.9333333 ^{ab}	4.5933 ^{bc}	13.8838 ^{bcd}	1.525 ^{abcd}
8	0.137 ^b	25.2666 ^a	4.42 ^{bcd}	11.7885 ^{cde}	2.1583 ^{abc}
10	0.248 ^a	15.3333 ^{ab}	4.1666 ^{cd}	11.2647 ^{cde}	2.355 ^{ab}
22	0.154 ^{ab}	15.6 ^{ab}	3.7266 ^d	7.1980 ^{de}	2.5783 ^a
24	0.161 ^{ab}	28.4 ^a	3.7 ^d	5.8266 ^{de}	1.83 ^{abcd}
26	0.1576 ^{ab}	14.6666 ^{ab}	3.6733 ^d	6.5695 ^{de}	2.945 ^a
28	0.1263 ^{bc}	21.6 ^{ab}	3.5666 ^d	4.4361 ^e	2.0325 ^{abcd}
30	0.1716 ^{ab}	26.5333 ^a	3.58 ^d	4.5790 ^e	2.8466 ^a
32	0.169 ^{ab}	23.8 ^a	3.58 ^d	4.0457 ^e	2.8583 ^a

Diferentes letras en cada columna significan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Los valores de densidad óptica y producción de biomasa húmeda se reportan con valores bajos a lo largo de las primeras cuatro horas. Así, la densidad óptica se mantiene sin cambios significativos, lo que indica una fase de adaptación, en esta etapa según Caycedo et al. (2021) las bacterias ajustan su metabolismo al nuevo medio de cultivo. Al compararlo con los valores de biomasa húmeda, se observa un patrón similar, lo cual podría indicar que la velocidad de crecimiento es baja durante este periodo.

A partir de las 4 horas se registró un aumento significativo en la densidad óptica, alcanzando su valor máximo a las 10 horas. De manera similar, los valores de biomasa húmeda comenzaron a incrementarse a partir de las 4 horas, con un pico observado a las 8 horas. Dicho comportamiento se relaciona con un aumento en la tasa de crecimiento específica (μ), que fue de 0.1395 h^{-1} a las 4 horas, 0.1565 h^{-1} a las 6 horas y 0.1535 h^{-1} a las 8 horas. Este incremento coincide con la fase de crecimiento exponencial que se caracteriza porque en este periodo la tasa de crecimiento específico de las células aumenta gradualmente (Stanbury et al., 2016).

En horas posteriores al pico de densidad óptica, los valores se mantienen relativamente constantes, indicando que las bacterias han entrado en la fase estacionaria, en donde el número de bacterias no incrementa (Caycedo et al., 2021). Por otro lado, la biomasa húmeda muestra un comportamiento más variable, con valores significativamente altos en los tiempos 24, 30 y 32 horas. Sin embargo, la tasa de crecimiento específica (μ) muestra una disminución progresiva a partir de las 10 horas con un valor de 0.0728 h^{-1} , hasta alcanzar 0.0365 h^{-1} a las 32 horas. Este comportamiento es característico de cultivos microbianos que han alcanzado la fase estacionaria, en la cual, después de cierto tiempo, la tasa de crecimiento (μ) disminuye gradualmente hasta que cesa el crecimiento. El cese del crecimiento puede deberse al agotamiento de algún nutriente esencial en el medio (limitación del sustrato), a la acumulación de algún producto autotóxico del organismo en el medio (limitación de toxinas) o a una combinación de ambas (Stanbury et al., 2016).

Las diferencias entre los valores de densidad óptica y biomasa húmeda pueden explicarse por las diferencias en los principios de los métodos utilizados y sus limitaciones. Mientras que la densidad óptica mide únicamente la turbidez del cultivo, la biomasa húmeda toma en cuenta el peso total, lo que puede dar lugar a errores debido a los líquidos retenidos y otras partículas insolubles (Godbey, 2022; Reynoso et al., 2018; Wang N., 2009). Sin embargo, el valor de la densidad óptica no puede tomarse como una medida directa de la viabilidad celular porque esta técnica no distingue entre células viables y no viables, ya que ambas contribuyen por igual a la

absorbancia a una longitud de onda específica generalmente 600 nm. Además, cuando la muestra contiene una alta concentración de sólidos disueltos o partículas en suspensión, se produce dispersión múltiple de la luz, lo que reduce la precisión de la lectura al limitar la cantidad de luz que llega al detector (Acebo-González y Hernández-García, 2013).

No obstante, la tasa de crecimiento específica (μ) permite una mejor identificación de las fases del crecimiento microbiano, ya que este parámetro refleja de manera más precisa la actividad metabólica de las células, especialmente durante la fase exponencial, en la que μ alcanza su valor máximo (Stanbury et al., 2016). Por esta razón, su análisis es fundamental para determinar con mayor exactitud el momento de transición entre fases de crecimiento.

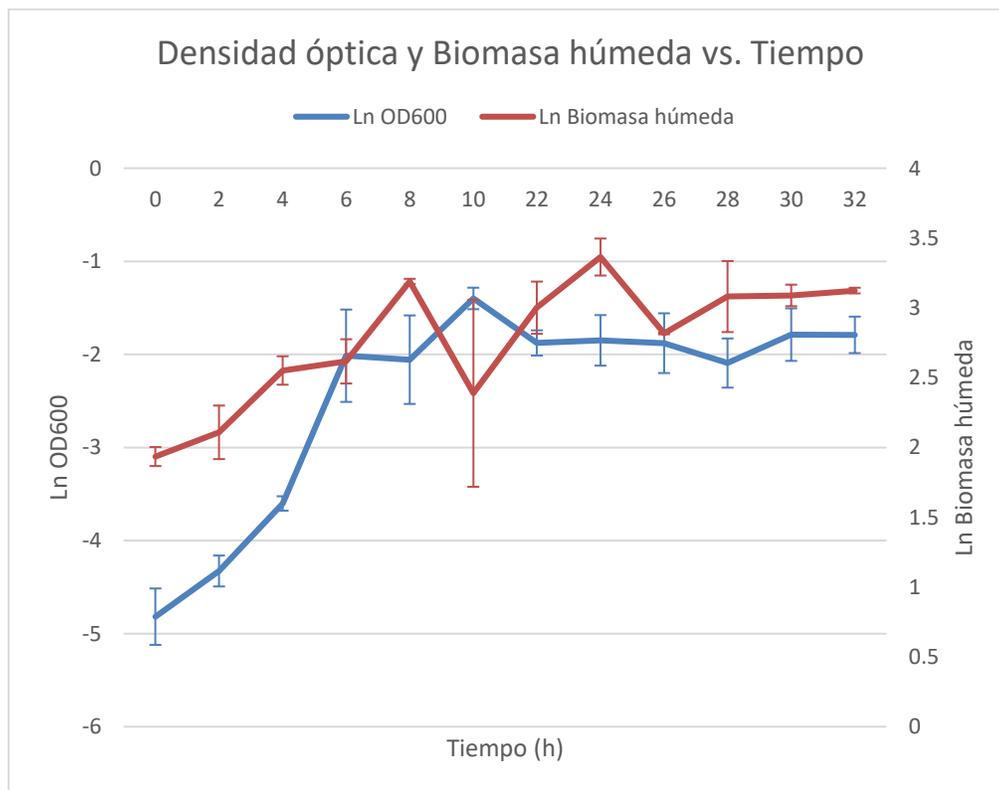


Figura 14. Crecimiento microbiano de la cepa seleccionada aislada del pulque, evaluado mediante densidad óptica (Ln OD600) y biomasa húmeda (Ln g) en función del tiempo de incubación. La densidad óptica y la biomasa fueron transformadas mediante logaritmo natural (Ln) para facilitar la interpretación de las fases de crecimiento. Los valores corresponden a la media de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

Los resultados obtenidos en la presente investigación sobre el crecimiento de *Lactocaseibacillus paracasei* son consistentes con los patrones de crecimiento descritos en la literatura para esta especie. En este estudio, se identificó una fase exponencial clara a partir de las 4 horas de fermentación, alcanzando un máximo entre las 8 y 10 horas, seguida de una fase estacionaria en la que los valores de densidad óptica y biomasa húmeda se estabilizaron. Este comportamiento concuerda con lo reportado por Pei et al. (2013), quienes documentaron que la fase exponencial de *L. paracasei* se iniciaba aproximadamente a las 7.5 horas, mientras que la fase estacionaria comenzaba alrededor de las 20 horas.

Asimismo, Denkova et al. (2014) reportaron una fase de adaptación de 6 horas para *L. paracasei*, seguida del inicio de la fase estacionaria poco después de las 9 horas, lo que refleja una dinámica de crecimiento similar a la observada en este experimento. Iseppi et al. (2019) también describieron un comportamiento comparable en *L. paracasei ssp. paracasei*, cuya fase exponencial comenzó tras 4 horas, con una absorbancia inicial de 0.007, alcanzando un valor máximo de 1.8 a las 16 horas. Estos datos coinciden con el patrón de incremento sostenido observado en este estudio durante las primeras 10 horas.

Por otro lado, Montero-Zamora et al. (2022) evaluaron el crecimiento de siete cepas distintas de *L. paracasei*, en las mismas condiciones y encontraron variaciones en el momento de máximo crecimiento, que oscilaron entre las 4 y las 14 horas, dependiendo de la cepa. Esta variabilidad resalta la influencia de factores como la genética de la cepa, el tipo de medio y las condiciones de incubación lo que podría explicar las pequeñas diferencias entre estudios.

En conjunto, estos hallazgos refuerzan la validez de los datos obtenidos en esta investigación y sugieren que la cepa nativa aislada del pulque presenta un comportamiento de crecimiento congruente con otras cepas de *L. paracasei* descritas previamente.

7.4.2 Evolución del pH

El análisis de RM-ANOVA (análisis de varianza de medidas repetidas) determinó que el pH del medio de cultivo varía de manera significativa a lo largo del tiempo ($p < 0.05$) (Tabla 3). De manera general, se observa una disminución progresiva del pH a medida que avanza el tiempo de fermentación (Figura 15). Esto indica un incremento en la acidificación del medio, lo cual es característico de los procesos fermentativos realizados por las bacterias ácido lácticas debido a la producción de grandes cantidades de ácido láctico (Caycedo et al., 2021).

La prueba de Tukey señala que a partir de las 22 horas se obtuvieron los valores más bajos ($p < 0.05$), manteniéndose constantes hasta el final de la fermentación. La disminución de pH a partir de este punto, coincide con la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, lo que puede atribuirse a la acumulación de productos metabólicos, como el ácido láctico, lo que provoca una inhibición de crecimiento bacteriano (Vera-Peña et al., 2022).

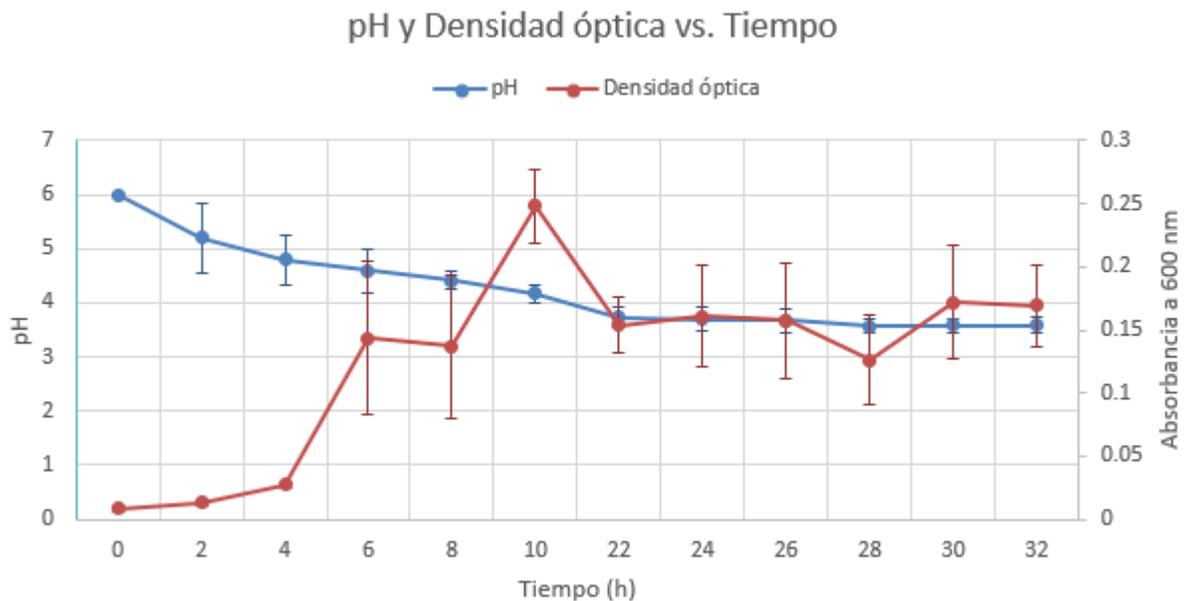


Figura 15. Variación del pH y la densidad óptica (OD600) durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

Estos resultados son consistentes con estudios previos que reportan una disminución significativa del pH durante la fermentación bacteriana. Por ejemplo, Slizweska y Chlebicz-Wójcik (2020) trabajaron con las cepas *Lb. paracasei* ŁOCK 1091, *Lb. pentosus* ŁOCK 1094, *Lb. plantarum* ŁOCK 0860, *Lb. Reuteri* ŁOCK1092, *Lb. rhamnosus* ŁOCK 1087 y observaron que el nivel de pH disminuyó desde 6 hasta valores que oscilaron entre $3,94 \pm 0,15$ y $4,18 \pm 0,19$, después de 30 horas de cultivo. Igualmente, Valdiviezo-Marcelo et al. (2023) observaron que cuatro diferentes cepas de *L. paracasei* redujeron el pH de la leche desde 6.6 hasta alcanzar niveles por arriba de 3.5 después de 48 horas, concluyendo que *L. paracasei* puede considerarse como una cepa potencial acidificante. En otro estudio, Rosales-Bravo et al. (2020) observaron que cepas de *L. casei* y *L. paracasei* disminuyeron el pH desde 6.5 a 3.5 a partir de las 24 horas de cultivo.

7.4.3 Evolución de la concentración de azúcares reductores

De acuerdo a la prueba ANOVA de medidas repetidas, existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los valores de azúcares reductores conforme avanza el tiempo. La prueba de Tukey de comparaciones múltiples arroja que a partir de las 4 y hasta las 10 horas existe una disminución significativa en la concentración de azúcares (Tabla 3). Esta disminución coincide con la fase de crecimiento exponencial (Figura 16), en donde la velocidad de crecimiento y el consumo de nutrientes son máximos (Caycedo et al., 2021). Después de las 10 horas, existe una disminución gradual y los valores de azúcares se mantienen constantes a niveles bajos, sin embargo, a partir de las 28 horas es en donde se registran los valores significativamente más bajos. Este descenso en la concentración de azúcares coincide con la fase estacionaria, donde no se incrementa el número de bacterias debido al agotamiento de nutrientes (Caycedo et al., 2021).

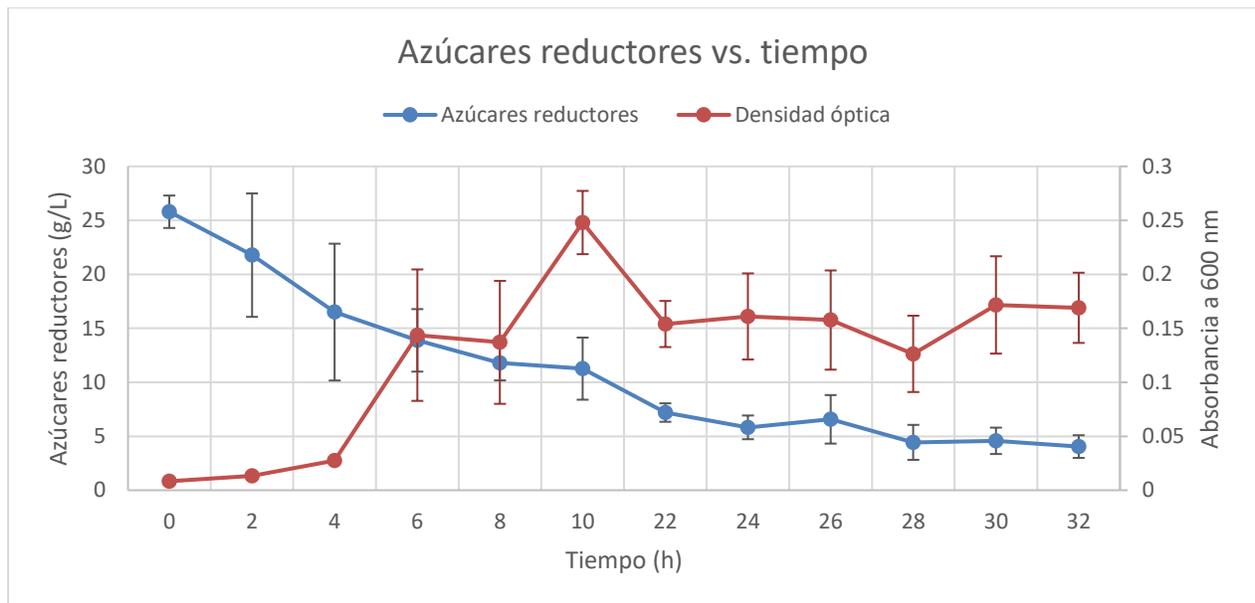


Figura 16. Consumo de azúcares reductores y variación de la densidad óptica durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia

Trabajos anteriores también han reportado un patrón similar en la dinámica de consumo de azúcares durante la fermentación de bacterias ácido lácticas. Por ejemplo, en el trabajo de Ardestani et al. (2015) la cepa *L. casei subsp. casei* PTCC1608 consumió el 79% del contenido de lactosa en el medio durante las primeras horas de incubación (en la fase adaptación y crecimiento exponencial). En contraste, en la fase estacionaria la concentración de lactosa disminuyó ligeramente de 10.5 a 8 g/L después de 22 horas del inicio de la fermentación,

manteniendo valores constantes de glucosa a partir de este punto. En otras investigaciones Rosales-Bravo et al. (2020) cultivaron tres cepas del grupo *L. casei*: *Lactobacillus casei* ATCC 393, *Lactobacillus paracasei* ATCC 25302 y *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, y observaron una reducción total del contenido de glucosa en el medio a 24 horas de la fermentación.

7.4.4 Evolución de la concentración de proteína

El análisis estadístico mediante ANOVA de medidas repetidas demostró diferencias significativas ($p < 0.05$) en los valores de concentración de proteína durante el proceso de fermentación (Tabla 3). Según el modelo de Tukey para comparaciones múltiples, se identificó un aumento significativo en la concentración de proteína a partir de las 6 horas de fermentación, pero, los valores significativamente más altos se obtuvieron a partir de las 22 horas en adelante (Figura 17).

Este incremento en la concentración de proteínas puede atribuirse a la autólisis celular de *Lactobacillus paracasei*. Durante las etapas avanzadas de la fermentación, las células bacterianas pueden experimentar estrés debido al agotamiento de nutrientes o a la acumulación de metabolitos tóxicos, lo que puede provocar la ruptura de la pared celular y la membrana, liberando proteínas al medio de fermentación. Pang et al. (2017) confirman que la autólisis realizada por las bacterias ácido lácticas normalmente ocurre cuando existe una alta densidad celular.

Otra posible causa del incremento en la concentración de proteínas es la secreción de proteínas extracelulares por parte de *Lactobacillus paracasei*. Entre estas proteínas, las bacteriocinas, al ser productos extracelulares, se secretan activamente al medio durante el crecimiento bacteriano. Estas moléculas se producen de forma continua a lo largo del proceso de fermentación y permanecen en el caldo fermentado, donde pueden ejercer su actividad antimicrobiana (Mora-Villalobos et al., 2020). Su presencia en el sobrenadante podría contribuir significativamente al aumento en la concentración proteica observada en etapas específicas del cultivo.

Además, *Lactobacillus* posee un sistema proteolítico que le permite obtener los aminoácidos necesarios para su crecimiento a partir de las proteínas de su entorno. De acuerdo a Raveschot et al. (2018) este mecanismo facilita la hidrólisis de proteínas, generando péptidos y aminoácidos libres en el medio de fermentación.

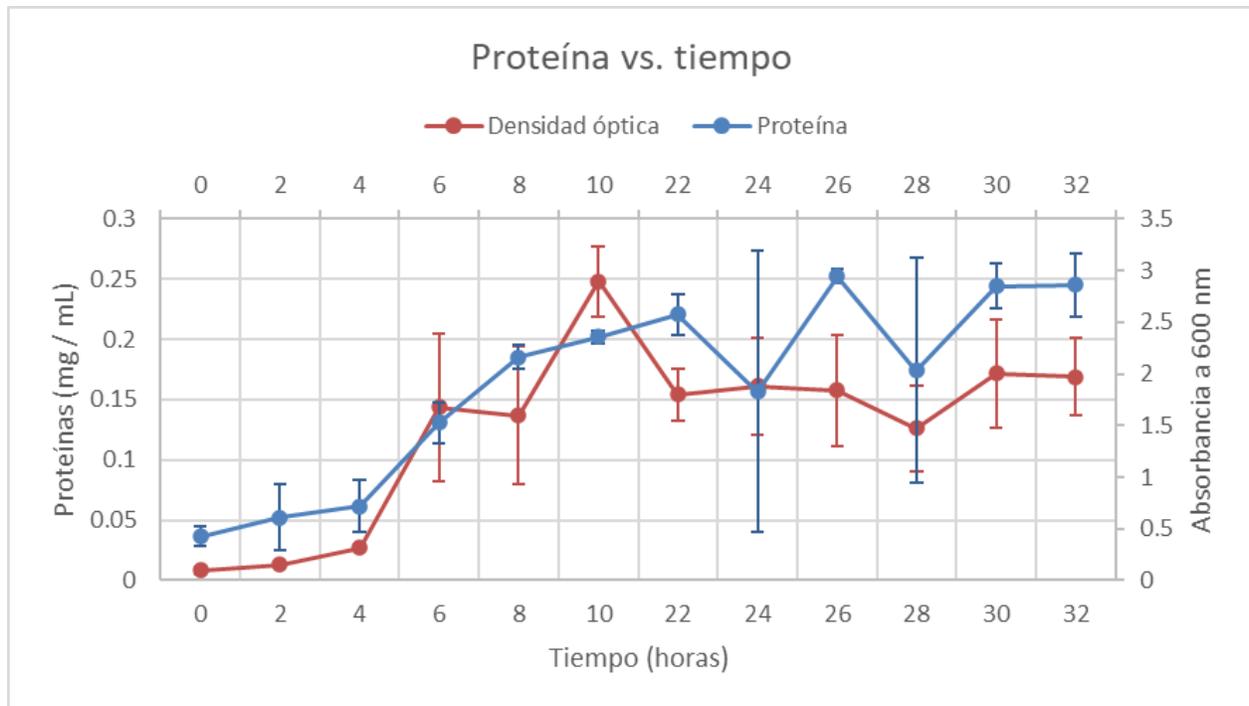


Figura 17. Variación de la concentración de proteína y densidad óptica durante el cultivo de la cepa seleccionada a lo largo de 32 horas de incubación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

7.5 Parámetros cinéticos de crecimiento microbiano

La figura 18 muestra la relación entre el crecimiento bacteriano y el consumo de sustrato de las primeras 8 horas de la fermentación. A partir de las 4 horas se inicia la fase exponencial, evidenciada por un aumento en la biomasa húmeda, mientras que la concentración de azúcares reductores disminuye de manera proporcional.

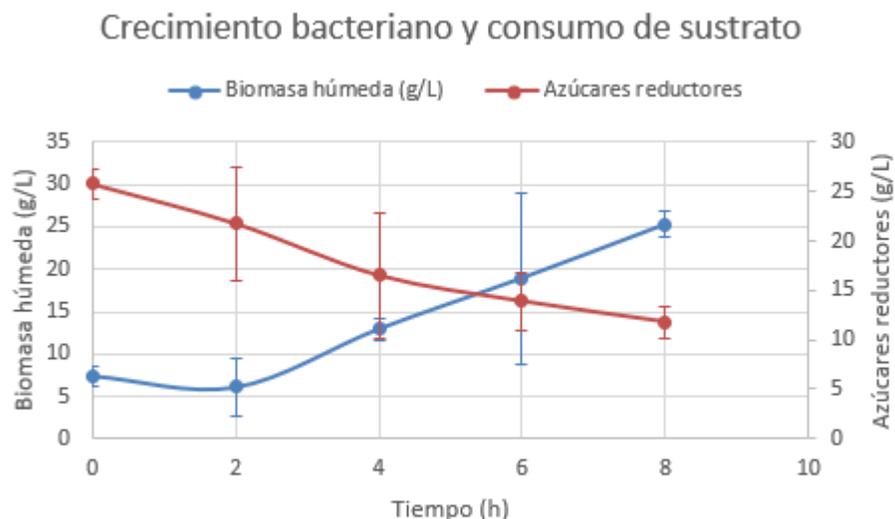


Figura 18. Relación entre el crecimiento bacteriano y el consumo de azúcares reductores en función del tiempo durante las primeras 8 horas de fermentación. Los valores representan el promedio de tres repeticiones \pm desviación estándar. Fuente: Elaboración propia.

Al realizar la fermentación a nivel matraz durante 32 horas se logró determinar la velocidad máxima específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$). Esta fue obtenida a partir de la pendiente resultante al graficar el logaritmo natural de la concentración de biomasa de la fase exponencial (4 a 8 h) en función del tiempo. Dependiendo del valor de $\mu_{\text{máx}}$ se pueden estimar las condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento bacteriano.

La fermentación se realizó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo MRS a 37 °C, sin agitación durante 32 horas. Se monitoreó la dinámica de los cambios en la biomasa de la cepa estudiada y se modeló su cinética de crecimiento. La duración de la fase de latencia fue aproximadamente de 4 horas, mientras que la fase exponencial se encontró de las 4 a las 8 horas. Se determinaron los parámetros básicos del bioproceso de la fermentación utilizando el modelo de Monod y se obtuvo una tasa de crecimiento específica (μ) de 0.1162 h^{-1} , la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{\text{máx}}$) fue de 0.1674 h^{-1} y una constante de saturación (K_s) de 11.33 g/L .

Al respecto, existen diversos reportes acerca de la máxima velocidad específica de crecimiento para el género *Lactocaseibacillus*. Por ejemplo, Denkova et al. (2014) estudiaron la cepa *Lactobacillus paracasei* RN5 en un biorreactor con un volumen de trabajo de 1.5 L con medio LAPTg10, operado durante 24 horas a 37 °C y compararon la velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{\text{máx}}$) en dos condiciones: estáticas y con agitación a 150 rpm. Los resultados

mostraron una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.26 h^{-1} en condiciones estáticas y de 0.756 h^{-1} bajo agitación. Así mismo, Slizweska y Chlebicz-Wójcik (2020) realizaron un experimento en donde se trabajó con *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus rhamnosus* en una fermentación por lote con medio MRS a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$, con un pH inicial de 6, durante 30 horas y se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.18 h^{-1} para *L. paracasei* y una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.12 h^{-1} para *L. rhamnosus*, un resultado similar al que se obtuvo en este trabajo.

Por su parte, Montero-Zamora et al. (2022) evaluaron siete cepas diferentes de *L. paracasei* y reportaron tasas de crecimiento que oscilaron entre $0.141 \pm 0.040 \text{ h}^{-1}$ y $0.366 \pm 0.046 \text{ h}^{-1}$. El valor obtenido en este estudio (0.1674 h^{-1}) se encuentra dentro de este rango, lo que confirma que la cepa aislada del pulque exhibe un comportamiento de crecimiento típico para el género.

En resumen, la velocidad máxima específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) obtenida, de 0.1674 h^{-1} , se encuentra dentro del rango reportado en la literatura para cepas del mismo género bajo condiciones similares, lo que resalta la influencia del medio de cultivo y las condiciones operativas sobre el crecimiento bacteriano. Además, es importante considerar que el tipo de cepa también puede influir significativamente en los parámetros cinéticos, ya que las características fisiológicas y metabólicas varían entre cepas, incluso dentro de la misma (Montero-Zamora et al., 2022).

En este ensayo, la cepa utilizada fue aislada de manera nativa del pulque, una bebida fermentada tradicional cuya microbiota se desarrolla en condiciones artesanales, con una diversidad microbiana compleja (Escobar-Zepeda et al., 2020). Estas condiciones favorecen interacciones sinérgicas entre bacterias ácido lácticas, levaduras y otras bacterias, lo que puede influir en la fisiología y comportamiento fermentativo de la cepa. Por ello, las diferencias observadas en la cinética de crecimiento pueden atribuirse tanto al origen de la cepa como a las condiciones experimentales empleadas.

Por otro lado, a partir de los valores obtenidos para la tasa de crecimiento específica ($\mu = 0.1162 \text{ h}^{-1}$), la tasa de crecimiento específica máxima ($\mu_{\text{máx}} = 0.1674 \text{ h}^{-1}$) y la constante de saturación ($K_s = 11.33 \text{ g/L}$), se realizó una simulación del proceso de fermentación utilizando el modelo de Monod. El objetivo de esta simulación fue evaluar el ajuste del modelo a los datos experimentales obtenidos durante la fermentación de *Lactobacillus paracasei*.

Para comparar ambos conjuntos de datos, se llevó a cabo un análisis de residuales, el cual permitió determinar la magnitud de las diferencias entre los valores simulados y los valores experimentales. Los resultados de este análisis indicaron que el modelo de Monod no se ajusta

adecuadamente a los datos experimentales (figuras 19 y 20), lo que sugiere la influencia de otros factores que no son considerados en dicho modelo.

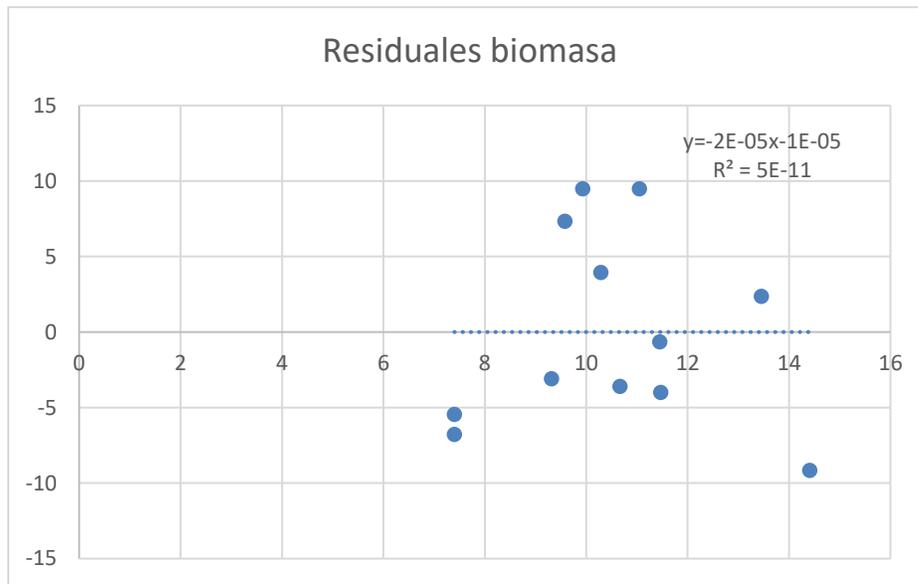


Figura 19. Análisis de residuales de los valores simulados y experimentales de biomasa.

Fuente: Elaboración propia.

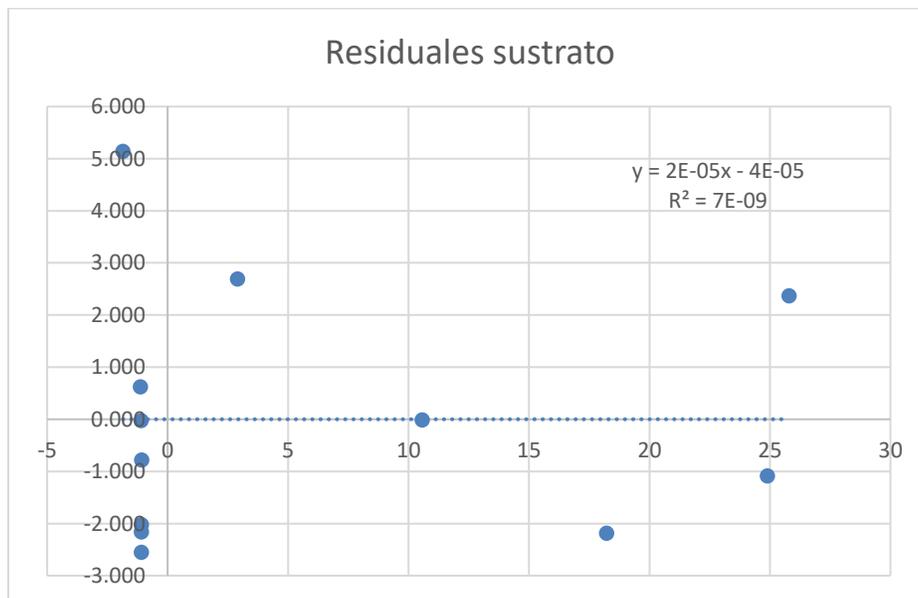


Figura 20. Análisis de residuales de los valores simulados y experimentales de sustrato.

Fuente: Elaboración propia.

El desajuste del modelo de Monod con los datos observados podría deberse a diversas limitaciones inherentes a este modelo. De acuerdo con Muloiwa et al. (2020) y Liu (2017), el modelo de Monod presenta cinco limitaciones principales que pueden afectar su precisión en la simulación del crecimiento microbiano.

En primer lugar, el modelo no describe adecuadamente el comportamiento del crecimiento bacteriano en condiciones de alta concentración de sustrato, ya que en este caso la tasa máxima de crecimiento específico se vuelve independiente de la concentración de sustrato, lo que puede generar desviaciones en la predicción del modelo.

En segundo lugar, en bajas concentraciones de sustrato, el crecimiento microbiano depende en gran medida de la disponibilidad de este, lo que puede hacer que el modelo no represente con precisión las condiciones limitantes de nutrientes observadas en el experimento.

La tercera limitación es que el modelo de Monod no es aplicable en sistemas donde el sustrato exhibe efectos de inhibición. En muchos procesos de fermentación, concentraciones elevadas de ciertos sustratos pueden generar efectos tóxicos o inhibitorios en las células, fenómeno que el modelo de Monod no contempla.

En cuarto lugar, el modelo no considera el requerimiento de sustrato para el mantenimiento celular durante la fase de muerte. En sistemas biológicos reales, las células continúan consumiendo nutrientes incluso cuando ya no están en fase de crecimiento activo, lo que puede generar discrepancias entre los valores observados y los predichos por el modelo.

Por último, el modelo de Monod no incorpora la fase de latencia ni la fase de muerte dentro del ciclo de crecimiento bacteriano, lo que puede afectar significativamente la capacidad del modelo para representar con precisión la dinámica del crecimiento bacteriano.

VIII. CONCLUSIONES

En el presente estudio se logró el aislamiento de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) nativas del pulque proveniente de un tinacal en el municipio de Singuilucan, Hidalgo. La cepa seleccionada fue identificada a través de la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S como *Lacticaseibacillus paracasei*

La evaluación de la actividad antimicrobiana mediante los ensayos de difusión en agar por gota reveló que los extractos presentaban capacidad de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes*, lo que confirmó su potencial como agente antimicrobiano.

El análisis de los sobrenadantes tratados con proteasa permitió confirmar la naturaleza proteica de los compuestos antimicrobianos, lo que sugiere que podrían pertenecer a la familia de las bacteriocinas.

Adicionalmente, se modeló el crecimiento bacteriano mediante el modelo de Monod, lo que permitió estimar parámetros cinéticos clave del proceso de fermentación. La tasa máxima específica de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) obtenida fue de 0.1674 h^{-1} , mientras que la constante de saturación (K_s) fue de 11.33 g/L . Estos valores se encuentran dentro del rango reportado en la literatura para cepas del mismo género.

El modelo aplicado proporcionó una aproximación útil para describir la dinámica de crecimiento de *L. paracasei* bajo las condiciones evaluadas.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abdullah, D., Poddar, S., Rai, R., Purwati, E., Dewi, N., y Pratama, Y. (2021). Molecular identification of lactic acid bacteria an approach to sustainable food security. *Journal of Public Health Research*, 10(2508). <https://doi.org/10.4081/jphr.2021.2508>
- Acebo-González, D., y Hernández-García, A. T. (2013). Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 44(1).
- Ahansaz, N., Tarrah, A., Pakroo, S., Corich, V., y Giacomini, A. (2023). Lactic Acid Bacteria in Dairy Foods: Prime Sources of Antimicrobial Compounds. *Fermentation*, 9(964), 1-21. <https://doi.org/10.3390/fermentation9110964>
- AL-Eitan, L., y Alnemri, M. (2022). Biosafety and biosecurity in the era of biotechnology: The Middle East region. *Journal of Biosafety and Biosecurity*, 4(2), 130-145. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2022.11.002>
- Arbulu, S., y Kjos, M. (2024). Revisiting the Multifaceted Roles of Bacteriocins. *Microbial Ecology*, 87(41), 1-14. <https://doi.org/10.1007/s00248-024-02357-4>
- Ardestani, F., Rezvani, F., y Najafpour, G. D. (2015). Evaluation of Cell Growth and Substrate Consumption Kinetic of Five Different *Lactobacilli* in a Submerged Batch Whey Culture for Lactic Acid Production. *International Journal of Engineering*, 28(7), 970-977.
- Arrijoja-Bretón, D., Mani-López, E., Palou, E., y López-Malo, A. (2020). Antimicrobial activity and storage stability of cell-free supernatants from lactic acid bacteria and their applications with fresh beef. *Food Control*, 115. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107286>
- Aslazadeh, J. (2006). Biochemical Profile-Based Microbial. En Y.-W. Tang, y C. W. Stratton, *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology* (pp. 84-116). Springer Nature.
- Astudillo-Melgar, F., Georgina, H.-C., Rodríguez-Alegría, M., Bolívar, F., y Escalante, A. (2023). Analysis of the Microbial Diversity and Population Dynamics during the Pulque Fermentation Process. *Fermentation*, 9(342), 1-17. <https://doi.org/10.3390/fermentation9040342>

-
- Ayivi, R., Gyawali, R., Krastanov, A., Aljaloud, S., Worku, M., Tahergorabi, R., y Ibrahim, S. (2020). Lactic Acid Bacteria: Food Safety and Human Health Applications. *Dairy*, 1, 202-232. <https://doi.org/10.3390/dairy1030015>
- Ballesteros-Rodríguez, E., y Sánchez-Teyer, L. (2021). El pulque: probiótico ancestral. *Elementos*, 28(121), 3-6. Elementos BUAP: <https://elementos.buap.mx/post.php?id=641>
- Belguesmia, Y., Bendjedou, K., Kempf, I., Boukherroub, R., y Drider, D. (2020). Heterologous Biosynthesis of Five New Class II Bacteriocins From *Lactobacillus paracasei* CNCM I-5369 With Antagonistic Activity Against Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 11(1198). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01198>
- Benkova, M., Soukup, O., y Marek, J. (2020). Antimicrobial susceptibility testing: currently used methods and devices and the near future in clinical practice. *Journal of Applied Microbiology*, 129, 806-822. <https://doi.org/10.1111/jam.14704>
- Björkroth, J., Dicks, L., y Holzapfel, W. (2015). *Weissella*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-15). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00609>
- Borrell, N., Acinas, S. G., Figueras, M.-J., y Martínez-Murcia, A. J. (1997). Identification of *Aeromonas* Clinical Isolates by Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified 16S rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(7), 1671-1674. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.7.1671-1674.1997>
- Caycedo, L., Corrales, L., y Trujillo, D. (2021). Las bacterias, su nutrición y crecimiento: una mirada desde la química. *Nova publicación científica en Ciencias biomédicas*, 19(36), 49-94. <https://doi.org/10.22490/24629448.5293>
- Cervantes-Elizarrarás, A., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E. V.-S., Velázquez-Guadarrama, N., Zafra-Rojas, Q., y Piloni-Martínez, J. (2019). In Vitro Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria Isolated from Aguamiel and Pulque and Antibacterial Activity Against Pathogens. *Applied Sciences*, 9(3). <https://doi.org/10.3390/app9030601>
- Cesa-Luna, C., Alatorre-Cruz, J.-M., Carreño-López, Q.-H. V., y Baez, A. (2021). Emerging Applications of Bacteriocins as Antimicrobials, Anticancer Drugs, and Modulators of The Gastrointestinal Microbiota. *Polish Journal of Microbiology*, 70(2), 143-159. <https://doi.org/10.33073/pjm-2021-020>

-
- Chen, T., Zhao, Y., Fan, Y., Dong, Y., y Gai, Z. (2025). Genome sequence and evaluation of safety and probiotic potential of *Lacticaseibacillus paracasei* LC86 and *Lacticaseibacillus casei* LC89. *Frontiers in Microbiology*, 15(1501502). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1501502>
- Christensen, T., Trabbic-Carlson, K., Liu, W., y Chilkoti, A. (2007). Purification of recombinant proteins from *E. coli* at low expression levels by inverse transition cycling. *Analytical Biochemistry*, 360(1), 166-168. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.09.020>
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840-862. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.4.840-862.2004>
- Contessa, C. R., da Rosa, J. V., de Ávila, M. T., da Rosa, G. S., Moraes, C. C., y Burket, J. F. (2025). Chemical and Biotechnological Processes Employed as Emerging Technologies for the Production and Stability of Bacteriocins. *Processess*, 13(44). <https://doi.org/10.3390/pr13010044>
- Daba, G., y Elkhateeb, W. (2024). Ribosomally synthesized bacteriocins of lactic acid bacteria: Simplicity yet having wide potentials – A review . *International Journal of Biological Macromolecules*, 256(1), 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128325>
- Denkova, R., Goranov, B., Denkova, Z., Kostov, G., y Georgieva, I. (2014). Determination of the kinetic parameters of batch fermentation of *Lactobacillus paracasei* RN5 with probiotic potential. *НАУЧНИ ТРУДОВЕ НА РУСЕНСКИЯ УНИВЕРСИТЕТ* , 53(10.2), 9-13.
- Di Conza, J. A. (2022). Aplicaciones de la espectrometría de masas MALDI-TOF en la microbiología clínica. *Revista Argentina de Microbiología*, 54(3), 163-165. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2022.08.001>
- Dinev, T., Rusenova, N., Velichkova, K., y Beev, G. (2022). Antimicrobial potential of eleven *Lacticaseibacillus paracasei* strains isolated from mountain anthills. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 28(5), 949-955.
- Escobar-Zepeda, A., Montor, J., Olvera, C., Sanchez-Flores, y Lopez-Munguia, A. (2020). An Extended Taxonomic Profile and Metabolic Potential Analysis of Pulque Microbial Community Using Metagenomics . *Journal of Food Science & Technology*, 5(2), 83-97. <https://doi.org/10.25177/JFST.5.2.RA.10637>

-
- Falfán-Cortés, R. N., Mora-Peñaflor, N., Gómez-Aldapa, C., Rangel-Vargas, E., Acevedo-Sandoval, O. A., Franco-Fernández, M. J., y Castro-Rosas, J. (2022). Characterization and Evaluation of the Probiotic Potential In Vitro and In Situ of *Lactocaseibacillus paracasei* Isolated from Tenate Cheese. *Journal of Food Protection*, 85, 112-121. <https://doi.org/10.4315/JFP-21-021>
- Fatima, M., Mehmood, S., Khanum, S., Rahman, A., Karnwal, A., Dey, A., y Ali, I. (2023). Lactic Acid Bacteria as a Source of Functional Ingredients. En A. Karnwal, y A. Rahman, *Food Microbial Sustainability* (pp. 153-173). Springer Nature Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-99-4784-3_8
- Fijan, S. (2016). Antimicrobial Effect of Probiotics against Common Pathogens. En A. Rao, y L. Rao, *Probiotics and Prebiotics in Human Nutrition and Health* (pp. 191-221). InTech. <https://doi.org/10.5772/63141>
- Flores-Maciel, H., Cordero-Soto, I., Ochoa-Martínez, L., Martínez-Herrera, E., y Rutiaga-Quiñones, O. (2024). Importancia de las bacterias ácido lácticas como productoras de exopolisacáridos. *Agraria*, 21(2), 5-11. <https://doi.org/10.59741/agraria.v21i2.38>
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Culafic, D., . . . Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review. *Antibiotics*, 11(427). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Gallardo-Martínez, D., Viniegra-González, G., Figueroa-Martínez, F., Rocha, y Cruz-Guerrero, A. (2024). Isolation and characterization of epiphytic, fructanolytic, homofermentative lactic acid bacteria from *Agave salmiana*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 23(1). <https://doi.org/10.24275/rmiq/Alim24142>
- Gänzle, M. (2015). Lactic metabolism revisited: metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 2, 106-117. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2015.03.001>
- Godbey, W. T. (2022). Chapter 5 - Cell growth. En W. T. Godbey, *Biotechnology and its Applications Using Cells to Change the World* (pp. 117-150). Academic Press.
- Gu, Q. (2023a). Chapter 2: Structure and Biosynthesis. En Q. Gu, *Bacteriocins* (pp. 7-39). Springer Nature Singapore.

-
- Gu, Q. (2023b). Chapter 3 Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria and Antibacterial Mechanisms. En Q. Gu, *Bacteriocins* (pp. 39-61). Springer Nature Singapore Pte Ltd.
- Hammes, W., y Hertel, C. (2015). *Lactobacillus*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-76). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00604>
- Hill, D., Sugrue, I., Tobin, C., Hill, C., Stanton, C., y Ross, P. R. (2018). The *Lactobacillus casei* Group: History and Health Related Applications. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02107>
- Holzapel, W., Björkroth, J., y Dicks, L. (2015). *Leuconostoc*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (pp. 1-23). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00607>
- Hossain, T. (2024). Methods for screening and evaluation of antimicrobial activity: A review of protocols, advantages, and limitations. *European Journal of Microbiology and Immunology*, 14(2), 97-115. <https://doi.org/10.1556/1886.2024.00035>
- Huezo-Sánchez, A., Ortega-Rodríguez, E., Pérez-Armendáriz, B., y El-Kassis, E. (2023). Characterization of Bacterial Diversity in Aguamiel and Two Types of Pulque from the Zacatlán Region, México. *Fermentation*, 9(564), 1-12. <https://doi.org/10.3390/fermentation9060564>
- Ibrahim, S., Ayivi, R., Zimmerman, T., Siddiqui, S., Altemimi, A., Fidan, H., . . . Bakhshayesh, R. (2021). Lactic Acid Bacteria as Antimicrobial Agents: Food Safety and Microbial Food Spoilage Prevention. *Foods*, 10(3131), 1-13. <https://doi.org/10.3390/foods10123131>
- INEGI. (2010). *Compendio de información geográfica municipal 2010. Singuilucan, Hidalgo*. INEGI.
- Iseppi, R., Messi, P., Camellini, S., y Sabia, C. (2019). Bacteriocin activity of *Lactobacillus brevis* and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. *Journal Of Medical Microbiology*, 68, 1359-1366. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001045>
- Jiang, Y.-H., Xin, W.-G., Yang, L.-Y. Y.-P., Zhao, Z.-S., Lin, L.-B., y Li, X.-Z. Z.-L. (2022). A novel bacteriocin against *Staphylococcus aureus* from *Lactobacillus paracasei* isolated from Yunnan traditional fermented yogurt: Purification, antibacterial characterization, and

-
- antibiofilm activity. *Journal of Dairy Science*, 105(3), 2094-2107. <https://doi.org/10.3168/jds.2021-21126>
- Ju, H., Chen, H., Xiang, A., Wang, Y., Yue, T., y Yuan, Y. (2021). Identification and characterization of *Lactobacillus paracasei* strain MRS-4 antibacterial activity against *Alicyclobacillus acidoterrestris* . *LWT - Food Science and Technology*, 150, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111991>
- Khan, Z. A., Siddiqui, M. F., y Park, S. (2019). Current and Emerging Methods of Antibiotic. *Diagnostics*, 9(49). <https://doi.org/10.3390/diagnostics9020049>
- Kristjansdottir, T., Bosma, E. F., Dos Santos, F. B., Özdemir, E., Herrgard, M. J., França, L., . . . Gudmundsson, S. (2019). A metabolic reconstruction of *Lactobacillus reuteri* JCM 1112 and analysis of its potential as a cell factory. *Microbial Cell Factories*, 18(186). <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12934-019-1229-3>
- Lahmamsi, H., Ananou, S., Lahlali, R., y Tahiri, A. (2024). Lactic acid bacteria as an eco-friendly approach in plant production: Current state and prospects. *Folia Microbiologica*, 69, 465-489. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s12223-024-01146-3>
- Li, L., y Han, N. (2018). Application of Lactic Acid Bacteria for Food Biotechnology. En H. Nam, *Emerging Areas in Bioengineering* (pp. 375-398). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527803293>
- Liang, Q., Zhou, W., Peng, S., Liang, Z., y Liu, Z. (2025). Current status and potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria applied in the food industry. *Current Research in Food Science*, 10(100997). <https://doi.org/10.1016/j.crf.2025.100997>
- Liu, S. (2017). Chapter 11 - How Cells Grow. En S. Liu, *Bioprocess Engineering (Second Edition)* (pp. 630-692). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00011-3>
- López-Ramírez, C., y Vélez-Ruiz, J. F. (2016). Aislamiento, Caracterización y Selección de Bacterias Lácticas Autóctonas de Leche y Queso Fresco Artesanal de Cabra. *Información Tecnológica* , 27(6), 115-128. <https://doi.org/10.4067/S0718-07642016000600012>
- Madigan, M., Bender, K., Buckley, D., Sattley, M., y Stahl, D. (2021). Firmicutes: Lactobacillales. En M. Madigan, K. Bender, D. Buckley, M. Sattley, y D. Stahl, *Brock Biology of Microorganisms* (Decimosexta ed., pp. 567-568). Pearson Education.

-
- Madrid, R. E., y Felice, C. J. (2005). Microbial Biomass Estimation. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 97-112. <https://doi.org/10.1080/07388550500248563>
- Maïwore, J., y Ngang, J.-J. (2023). Biotechnology of bacteriocins production by LAB. En R. Ray, *Lactic Acid Bacteria as Cell Factories* (pp. 289-310). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91930-2.00008-0>
- Martín-Platero, A., Valdivia, E., Maqueda, M., y Martínez-Bueno, M. (2007). Fast, convenient, and economical method for isolating genomic DNA from lactic acid bacteria using a modification of the protein “salting-out” procedure. *Analytical Biochemistry*, 366(1), 102-104. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.03.010>
- Mazzeo, L., y Piemonte, V. (2019). Fermentation and biochemical engineering: principles and applications. En A. Basile, G. Centi, M. De Falco, y G. Iaquaniello, *Catalysis, Green Chemistry and Sustainable Energy* (pp. 261-285). 10.1016/B978-0-444-64337-7.00015-X.
- Medina-Mendoza, C., Roldán-Cruz, E., y Vázquez-Jahuey, M. (2023). Physicochemical, microbiological and organoleptic characterization of aguamiel and pulque from Alto Mezquital, Hidalgo. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 19(4), 448-462. <https://doi.org/10.22231/asyd.v19i4.1412>
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Journal of Analytical Chemistry*, 31, 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Monod, J. (1949). The Growth of Bacterial Cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.03.100149.002103>
- Montero-Zamora, J., Rojas-Vargas, M. D., Barboza, N., Barboza, López-Gómez, J. P., Mora-Villalobos, J. A., y Redondo-Solano, M. (2022). Potential of New Bacterial Strains for a Multiproduct Bioprocess Application: A Case Study Using Isolates of Lactic Acid Bacteria from Pineapple Silage of Costa Rican Agro-Industrial Residues. *Fermentation*, 8(361). <https://doi.org/10.3390/fermentation8080361>
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., . . . López-Gómez, J. P. (2020). Multi-Product Lactic Acid Bacteria Fermentations: A Review. *Fermentacion*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>

-
- Muloiwa, M., Nyende-Byakika, S., y Dinka, M. (2020). Comparison of unstructured kinetic bacterial growth models. . *South African Journal of Chemical Engineering*, 33, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.sajce.2020.07.006>
- Negash, A. W., y Tsehai, B. A. (2020). Current Applications of Bacteriocin. *International Journal of Microbiology*, 2020, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2020/4374891>
- Pang, X., Zhang, S., Lu, J., Liu, L., Ma, C., Yang, Y., . . . Lv, J. (2017). Identification and Functional Validation of Autolysis—Associated Genes in *Lactobacillus bulgaricus* ATCC BAA-365. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01367>
- Pei, J., Yuan, Y., y Yue, T. (2013). Primary characterization of bacteriocin paracin C - A novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei*. *Food Control*, 34(1), 168-176. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.03.040>
- Periódico Oficial Gobierno Constitucional del Estado México. (1977). *Reglamento para el control sanitario del pulque*. Secretaria de Salubridad y Asistencia. <https://legislacion.edomex.gob.mx/sites/legislacion.edomex.gob.mx/files/files/pdf/gct/1977/ene201.pdf#:~:text=%2D%2DEI%20pulque%20para%20consumo%20p%C3%ABlico%20y%20duran%2D,contamina%2D%20ci%C3%B3n%20o%20alteraci%C3%B3n%20de%20sus%20cualidades.&text=Il%>
- Pirt, S. J. (1965). The maintenance energy of bacteria in growing cultures. *Proceedings of the Royal Society B Biological Sciences*, 163(991), 224-231. <https://doi.org/https://doi.org/10.1098/rspb.1965.0069>
- Raveschot, C., Cudennec, B., Coutte, F., Flahaut, C., Fremont, M., Drider, D., y Dhulster, P. (2018). Production of Bioactive Peptides by *Lactobacillus* Species: From Gene to Application. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02354>
- Reuben, R. C., y Torres, C. (2024). Bacteriocins: potentials and prospects in health and agrifood systems. *Archives of Microbiology*, 206(233). <https://doi.org/10.1007/s00203-024-03948-y>
- Reynoso, M., Magnoli, C., Barros, G., y Demo, M. (2018). 5.2.1: *Estimación de la masa celular*. LibreTexts Español:
https://espanol.libretexts.org/Biologia/Microbiolog%C3%ADa/Manual_de_microbiolog%C3%ADa_general/05%3A_Metodos_de_recuento_de_poblaciones_microbianas/5.02%3A_Estimacion_del_crecimiento_microbiano/5.2.01%3A_Estimacion_de_la_masa_celular

-
- Rezvani, F., Ardestani, F., y Najafpour, G. (2017). Growth kinetic models of five species of *Lactobacilli* and lactose consumption in batch submerged culture. *Brazilian Journal Of Microbiology*, 48, 251-258. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.007>
- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., y Lonvaud, A. (2021). Metabolism of Lactic Acid Bacteria. En P. Ribéreau-Gayon, D. Dubourdieu, B. Donèche, y A. Lonvaud, *Handbook of Enology, Volume 1: The Microbiology of Wine and Vinifications* (pp. 145-195). John Wiley & Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119588320.ch5>
- Rocha-Arriaga, C., Espinal-Centeno, A., Martínez-Sánchez, S., Caballero-Pérez, J., Alcaraz, L., y Cruz-Ramírez, A. (2020). Deep microbial community profiling along the fermentation process of pulque, a biocultural resource of Mexico . *Microbiological Research* , 241, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126593>
- Rodríguez, P. A., y Arenas, R. (2018). Hans Christian Gram y su tinción. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica*, 16(2), 166-167. <https://www.medigraphic.com/pdfs/cosmetica/dcm-2018/dcm182n.pdf>
- Rodríguez-Juárez, F., Urbina-Carrasco, H., y Zapata-Hernández, A. (2021). Pulque: Contenido probiótico y potencial en la industria biotecnológica. *Revista RD*, 7(20), 95-110.
- Rosales-Bravo, H., Vázquez-Martínez, J., Morales-Torres, H. C., y Olalde-Portugal, V. (2020). Evaluación de propiedades tecno-funcionales de cepas probióticas comerciales del género *Lactobacillus*. *Revista Internacional de Investigación e Innovación Revista Internacional de Investigación e Innovación* , 8(45), 1-19.
- Roy, B., Das, T., y Bhattacharyya, S. (2023). Overview on Old and New Biochemical Test for Bacterial Identification. *Journal of Surgical Case Reports and Images*, 6(2), 1-11. <https://doi.org/10.31579/2690-1897/163>
- Ruíz-Ramírez, Y., Guadarrama-Mendoza, P., Escalante, A., Giles-Gómez, M., y 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. *Brazilian Journal of Microbiology*, 53, 91-933. <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00684-7>

Salam, A. M., Al-Amin, Y. M., Pawar, J., Akhter, N., y Lucy, I. (2023). Conventional methods and future trends in antimicrobial. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 30(103582). <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2023.103582>

Sánchez Reyes, W. Y. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria alimentaria, mediante el cultivo de la bacteria ácido láctica, Streptococcus infantarius, en medios complejos que contienen melazas, [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo]*. UAEH Biblioteca Digital. <https://doi.org/http://dgsa.uaeh.edu.mx:8080/bibliotecadigital/handle/231104/3626>

Secretaría de Salud. (1994a). *NOM-110-SSA1-1994, Bienes y servicios. Preparación y dilución de muestras de alimentos para su análisis microbiológico*. Diario Oficial de la Federación.

Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. (2 de Septiembre de 2015). *Pulque, bebida de Dioses....* Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/pulque-bebida-de-dioses#:~:text=El%20pulque%20es%20una%20bebida,popularmente%20conocido%20como%20%E2%80%9Caguamiel%E2%80%9D>.

Secretaría de Salud. (1994b). *NOM-092-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la cuenta de bacterias aerobias en placa*. Diario Oficial de la Federación.

Sharma, B., Halami, P., y Tamang, J. (2022). Novel pathways in bacteriocin synthesis by lactic acid bacteria with special reference to ethnic fermented foods. *Food Science and Biotechnology*, 31(1), 1-16. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00986-w>

Slizweska, K., y Chlebicz-Wójcik, A. (2020). Growth Kinetics of Probiotic Lactobacillus Strains in the Alternative, Cost-E cient Semi-Solid the Alternative, Cost-E cient Semi-Solid. *Biology*, 9(423), 1-13. <https://doi.org/10.3390/biology9120423>

Solis-Balandra, M. A., Sanchez-Salas, y Luis, J. (2024). Classification and Multi-Functional Use of Bacteriocins in Health, Biotechnology, and Food Industry. *Antibiotics*, 13(666). <https://doi.org/10.3390/antibiotics13070666>

Spinler, J., Auchtung, J., Brown, A., Boonma, P., Oezguen, N., Ross, C., . . . Savidge, T. (2017). Next-Generation Probiotics Targeting *Clostridium difficile* through Precursor-Directed Antimicrobial Biosynthesis. *Infection and Immunity*, 85(10), 1-16. <https://doi.org/10.1128/iai.00303-17>

-
- Stanbury, P. F., Whitaker, A., y Hall, S. J. (2016). Chapter 2 - Microbial growth kinetics. En P. F. Stanbury, A. Whitaker, y S. J. Hall, *Principles of Fermentation Technology* (pp. 21-74). Elsevier Ltd.
- Suárez-Contreras, L. Y., y Yañez-Meneces, L. F. (2020). 16S rRNA as an applied tool in the molecular characterization of genera and species of bacteria. *Respuestas Journal of Engineering Sciences*, 25(1), 127-136. <https://doi.org/10.22463/0122820X.2430>
- Tamang, J. P. (2014). Biochemical and Modern Identification Techniques | Microfloras of Fermented Foods. *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, 250-258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00038-0>
- Teuber, M. (2015). *Lactococcus*. En *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria (BMSAB)* (pp. 1-21). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm00610>
- Thermo Scientific. (2016). Measure dsDNA, ssDNA or RNA. En T. Scientific, *NanoDrop One User Guide* (p. 21). Thermo Fisher Scientific Inc.
- Thermo Scientific NanoDrop Spectrophotometers. (2010). *Protein A280*. Thermo Fisher Scientific. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Warranties/Thermo-Scientific-NanoDrop-Products-Protein-Technical-Guide-EN.pdf>
- Valdiviezo-Marcelo, Arana-Torres, N., Vega-Portalatino, E., Ruiz-Flores, L., Tamariz-Angeles, C., Olivera-Gonzales, P., . . . Espinoza-Espinoza, L. (2023). Technological potential of native lactic acid bacteria isolated from Swiss-type artisanal cheese. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 7(1212229), 1-17. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2023.1212229>
- Van Bodegom, P. (2007). Microbial Maintenance: A Critical Review on Its Quantification. *Microbial Ecology*, 53, 513-523. <https://doi.org/10.1007/s00248-006-9049-5> &
- Vera-Peña, M. Y., Hernández-García, H., y Valencia-García, F. E. (2022). Kinetic modeling of lactic acid production, co-substrate consumptions and growth in *Lactiplantibacillus plantarum* 60-1. *DYNA*, 89(224), 50-57. <https://doi.org/10.15446/dyna.v89n224.102243>
- Wang, N. (2009). *Experiment No. 9C Measurements of Cell Biomass Concentration*. University of Maryland: <https://user.eng.umd.edu/~nsw/ench485/lab9c.htm>

-
- Wang, X., Wang, W., Lv, H., Zhang, H., Liu, Y., Zhang, M., . . . Tan, Z. (2020). Probiotic Potential and Wide-spectrum Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Infant Feces. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09658-3>
- Wang, Y., Shang, N., Huang, Y., Gao, B., y Li, P. (2024). The Progress of the Biotechnological Production of Class IIa Bacteriocins in Various Cell Factories and Its Future Challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(5791). <https://doi.org/10.3390/ijms25115791>
- Wang, Y., Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., . . . Geng, W. (2021). Metabolism Characteristics of Lactic Acid Bacteria and the Expanding Applications in Food Industry. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 9(612285), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., y Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yang, M.-Q., Wang, Z.-J., Zhai, C.-B., y Chen, L.-Q. (2024). Research progress on the application of 16S rRNA gene sequencing and machine learning in forensic microbiome individual identification. *Frontiers in Microbiology*, 15(1360457). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1360457>
- Yang, Y., Xu, Y., He, X., Guo, M., Chen, J. L., y Xiang, J. (2025). Characterizations of lactic acid bacteria derived from pickles and the effects of fermentation on phenolic compounds in peony flowers. *Food Chemistry X*, 27(102430). <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102430>
- Ye, P., Wang, J., Liu, M., Li, p., y Gu, Q. (2021). Purification and characterization of a novel bacteriocin from *Lactobacillus paracasei* ZFM54 . *LWT- Food Science and Technology*, 143, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111125>
- Zepeda-Velazquez, A. P., Gómez-De-Anda, F.-R., Aguilar-Mendoza, L. F., Castrejón-Jiménez, N. S., Hernández-González, J. C., Varela-Guerrero, J. A., . . . Reyes-Rodríguez, N. E. (2023). Bullfrogs (*Lithobates catesbeianus*) as a Potential Source of Foodborne Disease. *Journal of Food Protection*, 86(1). <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100067>

Zhao, T., Doyle, M. P., y Zhao, P. (2004). Control of *Listeria monocytogenes* in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.70.7.3996-4003.2004>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C., Harris, H., Mattarelli, P., . . . Lebeer, S. (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. *International Journal Of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(4), 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>