

**Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del I.P.N Unidad Irapuato**

Departamento de Biotecnología y Bioquímica

**“Aislamiento, selección y caracterización de bacterias
procedentes de heces de infantes lactantes con capacidad de
producción de aminoácidos ramificados y potencial probiótico”**

Tesis que presenta

M.C. Hugo Rosales Bravo

**Para obtener el grado de Doctor en Ciencias en la Especialidad de
Biotecnología de Plantas**

Co-Directores de tesis

Dra. Laila Pamela Partida Martínez

Dr. Victor Olalde Portugal

Irapuato, Gto.

Agosto de 2017

El presente proyecto de investigación fue realizado en los laboratorios de Bioquímica Ecológica e Interacciones Microbianas, pertenecientes a los departamentos de Biotecnología y Bioquímica, e Ingeniería Genética del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Unidad Irapuato, bajo la dirección del Dr, Victor Olalde Portugal y la Dra. Laila Pamela Partida Martínez, investigadores titulares de dichos laboratorios.

El período de realización de este proyecto abarco de 03/09/2011 al 30/08/2017 bajo la colaboración del comité tutorial conformado de la siguiente manera:

Dra. Gabriela Olmedo Álvarez, actual Directora del CINVESTAV unidad Irapuato e investigadora titular del laboratorio de Bacteriología Molecular, perteneciente al departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Dr. Robert Winkler, investigador titular del laboratorio de Análisis Bioquímico e Instrumental, perteneciente al departamento de Biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Dra. Silvia Edith Valdés Rodríguez, investigadora titular del laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas, perteneciente al departamento de biotecnología y Bioquímica del CINVESTAV Unidad Irapuato.

Dr. José Eleazar Barboza Corona, investigador titular del cuerpo académico Biotecnología Agrícola, perteneciente al departamento de Alimentos de División Ciencias de la Vida Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato.

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico otorgado durante la realización del proyecto, bajo el registro de becario 172559.

Al Dr. Victor Olalde Portugal por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y apoyarme durante la realización del proyecto, además de su motivación y ejemplo a seguir como ser humano.

A la Dra. Laila Pamela Partida Martínez por su importante contribución en la realización del proyecto, su gran enseñanza, paciencia y motivación. Además de inculcarme a seguir mejorando constantemente.

A mi comité de sinodales por valiosas aportaciones para la mejora del proyecto.

A mi familia que incondicionalmente siempre me han apoyado al cumplimiento de mis metas. A mis padres Estela Bravo Escoto y José Gpe. Rosales Moreno que siempre han sido mi mayor motivación para salir adelante. A mis hermanos Alma Delia, Raúl, Estela y Carlos Alberto, de los cuales siempre he contado con su apoyo.

A todos mis amigos y compañeros que de alguna forma contribuyeron en el logro de esta meta. Carolina Arredondo, Edgar Chantres, Adrián Alvarado, Michel Nolasco, Araceli Valdés, Gloria León, Araceli Minguela, José Alfredo López, Liliana Calderón, Genaro Salazar, Ricardo Ortega, Liliana J. Hernández, Milton Ruiz, Juan Vázquez, Adán Torres, Isabel Notario, Horacio C. Morales, Margarita Pérez, Rosario Flores, Minerva, Génesis Buitimeac, Paulina, Rosibel Monteón, Bertha Alicia, Fátima Villanueva, Indira Borrayo, Angélica Acosta, Mónica Rodríguez, Luis, Norma Caudillo, Itzel Barragán, Manuel Alcauter, Cuquita, y la Dra. Mayela Bautista.

A Berenice Cuevas, Yolanda Rodríguez, Rosalinda Serrato y Nélida Vázquez por el apoyo en la aplicación de técnicas experimentales aplicadas en el desarrollo del proyecto, por su paciencia y sobre todo por su amistad.

Al personal del Cinvestav Unidad Irapuato: Dora Elia Anguiano, Humberto Torres, Guadalupe Torres, Rodolfo y Carmelita de Biblioteca y Antonio el fotógrafo, por su apoyo en todo momento.

Agradecimiento especial a Dora Elia Anguiano, Humberto Torres y Rosalinda Serrato por todo el cariño, apoyo y amistad que me han brindado durante todos estos años, por hacerme sentir como parte importante de su vida.

Prométete a ti mismo

Ser tan fuerte que nada pueda turbar la paz de tu mente.

Hablar de salud, de felicidad y prosperidad a todos aquellos con quienes tengas que trabajar.

Hacer que tus amigos sepan que algo bueno y noble hay en ellos.

Mirar todas las cosas por el lado bueno, y procurar que tu entusiasmo se haga real y verdadero.

Pensar sólo en lo mejor, trabajar por lo mejor y esperar lo mejor.

Ser justo y entusiasta por el éxito de otros, como lo eres por el tuyo propio.

Olvidar los errores del pasado y perseverar para las más grandes obras del futuro.

Mantener un semblante alegre en todo momento y tener siempre una sonrisa para tus semejantes.

Ocuparte del mejoramiento de ti mismo en forma tal, que no tengas tiempo de criticar a los demás.

Tener alma grande para el sufrimiento y mucha nobleza para la cólera; fortaleza para el temor y felicidad para no permitir la presencia de la tristeza.

Pensar bien de ti mismo y proclamar este hecho al mundo, no en voz alta sino con obras meritorias.

Vivir en la creencia de que el mundo está de tu parte mientras tú seas fiel a lo mejor que hay en ti.

Juan Antonio Razo G.

RESUMEN

La producción de aminoácidos por bacterias intestinales constituye un mecanismo de reciclaje intestinal que contribuye a mejorar el estado nutricional del huésped. En este estudio, se aislaron, seleccionaron y caracterizaron bacterias a partir de heces de infantes lactantes con capacidad de producción de aminoácidos ramificados y potencial probiótico. Adicionalmente, se evaluó su uso potencial como cultivo iniciador funcional mixto con cepas probióticas para la elaboración de alimentos fermentados a través del incremento de biodisponibilidad de aminoácidos y producción de volátiles en fermentación de leche.

De un total de 344 aislados, se seleccionaron cinco basados en su capacidad de producción de aminoácidos de cadena ramificada. De estos, tres fueron identificados molecular y bioquímicamente como *Escherichia coli*, uno como *Klebsiella pneumoniae* y uno como *Klebsiella variicola*. El perfil de aminoácidos generado por estos aislados fue afectado por el medio de fermentación. En medio de aislamiento (MRS) los aislados correspondientes a *E. coli* presentaron la mayor producción de aminoácidos ramificados, sin embargo, en fermentación de leche por cultivos mixtos con cepas probióticas de *Lactobacillus*, el aislado correspondiente a *K. variicola* destacó en la producción de Leu, Ile, Met, Glu, Ser y Tyr. Adicionalmente, este consorcio bacteriano notablemente favoreció e incrementó la producción de compuestos volátiles, tales como: acetoina, etanol, 2-nonanona y ácidos cético, hexanoico y octanoico en comparación con productos lácteos fermentados comerciales (yogurt, queso Emental y Gouda).

Finalmente, en la evaluación probiótica los aislados correspondientes a *K. pneumoniae* y *K. variicola* resultaron ser los más tolerantes a pH y sales biliares, con resultados similares a cepas control. Sin embargo, ninguno de ellos presentó actividad antimicrobiana contra patógenos Gram negativos, y presentaron un efecto inhibitorio de débil a moderado por las cepas control.

Con base en esto se sugiere que el consorcio microbiano formado por las cepas de *Lactobacillus* y *K. variicola* podría representar una alternativa como cultivo probiótico mixto dirigido al incremento de biodisponibilidad de aminoácidos ramificados a partir de proteína láctea, lo cual tiene repercusión en el estado de salud del huésped mediante el efecto de estos

aminoácidos en la síntesis de proteína muscular. Adicionalmente, el perfil de volátiles podría sugerir su uso potencial como cultivo iniciador en alimentos lácteos fermentados funcionales.

ABSTRACT

The production of amino acids by intestinal bacteria is a recycling mechanism that contributes to improve the nutritional status of the host. In this study, we isolated and characterized bacteria from infants' faeces and evaluated their capacity to produce and/or secrete branched-chain amino acids in synthetic media. We also evaluated the probiotic potential of the novel strains through pH, bile and lysozyme tolerance, antimicrobial activity as well as their compatibility with known probiotic strains. Lastly, their potential as mixed functional starter culture for the elaboration of fermented dairy foods was tested through the production of amino acids and volatiles in milk fermentation.

From more than 300 isolates, five were selected based on their ability to produce and/or secrete branched-chain amino. Three of these strains were identified by biochemical and molecular analyses as *Escherichia coli*, one as *Klebsiella pneumoniae* and the last one as *Klebsiella variicola*. In skim milk, the consortium formed by four *Lactobacillus* strains displayed the best performance in the production of essential amino acids such as Leu, Val, Ile, Lys, Met, Thr and Trp. However, by adding *K. variicola* to this consortium, the production of total free amino acids increased, especially Leu and Met, while production of Ile was similar. This novel consortium showed the best production of non-essential amino acids Glu, Ser and Tyr. In addition, the acidification profile was notably favoured and the production of volatile compounds, such as: acetoin, ethanol, 2-nonanone, and acetic,

hexanoic and octanoic acids increased in comparison to commercial fermented dairy products (Yogurt, Emmental and Gouda cheese).

In terms of their probiotic potential, *K.pneumoniae* and *K. variicola* proved to be the most tolerant strains to pH, bile and lysozyme. However, none of them had antimicrobial activity against Gram negative pathogens, and they all were weakly or moderately inhibited by the control strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

According to the results obtained in this study, the microbial consortium formed by four strains of *Lactobacillus* and *K.variicola* represents a novel mixed probiotic culture that increases the bioavailability of branched amino acids from milk protein, which improves host' health by the effect of these amino acids on muscle protein synthesis. Additionally, the volatile profile generated by this consortium suggests its potential use as a starter culture in functional fermented dairy foods.

ÍNDICE GENERAL

| Contenido | Página |
|--|--------|
| 1. Marco teórico | |
| 1.1. Definición de probiótico | 1 |
| 1.2. Taxonomía y características generales de probióticos | 1-3 |
| 1.3. Flora intestinal y probióticos | 4-7 |
| 1.4. Criterios de evaluación de probióticos | 7 |
| 1.5. Mecanismos de acción y aplicaciones clínicas | 7-8 |
| 1.6. Microbiota intestinal y síntesis de aminoácidos | 8-9 |
| 1.7. Producción de aminoácidos por bacterias | 9-16 |
| 1.7.1. Producción de aminoácidos vía <i>de novo</i> | 10-11 |
| 1.7.2. Producción de aminoácidos vía sistema proteolítico | 11-16 |
| 1.8. Importancia de los aminoácidos ramificados en la salud humana | 16-20 |
| 2. Hipótesis | 21 |
| 3. Objetivos | 21 |
| 3.1. Objetivo General | 21 |
| 3.2. Objetivos Específicos | 21 |
| 4. Materiales y Métodos | |
| 4.1. Microorganismos control | 22 |
| 4.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento | 22 |
| 4.3. Muestreo | 22-23 |
| 4.4. Tratamiento de la muestra | 23 |
| 4.5. Aislamiento | 23 |
| 4.6. Purificación y conservación de aislados | 23-24 |
| 4.7. Estandarización de inóculo | 24 |
| 4.8. Preselección de aislados | 24 |
| 4.9. Selección de aislados productores de aminoácidos ramificados | |
| 4.9.1. Fermentación | 25 |
| 4.9.1.1. Estandarización de condiciones | 25 |
| 4.9.1.2. Condiciones de selección de aislados | 25 |
| 4.9.1.3. Determinación de aminoácidos libres | 25-26 |
| 4.10. Producción de aminoácidos en medio mineral | 26 |
| 4.11. Producción de aminoácidos por consorcios microbianos | 26-27 |
| 4.12. Identificación de aislados productores | |
| 4.12.1. Identificación molecular | 27-28 |
| 4.12.1.1. Amplificación del gen ribosomal 16S rARN | 27 |
| 4.12.1.2. Determinación del perfil lipídico celular | 28 |
| 4.12.2. Identificación bioquímica | 28-29 |

| | |
|--|-------|
| 5.13. Evaluación de propiedades probióticas | |
| 5.13.1. Tolerancia a pH y bilis | 29-30 |
| 5.13.2. Crecimiento a diferentes pHs, concentraciones de bilis y lisozima | 30 |
| 5.13.3. Actividad antimicrobiana contra patógenos Gran negativos | 30-31 |
| 5.13.4. Compatibilidad entre aislados y con cepas probióticas | 31 |
| 5.14. Potencial aplicación como cultivos mixtos iniciadores funcionales ... | 31 |
| 5.14.1 Cambio de pH y células viables en consorcio microbiano | 31-32 |
| 5.14.2 Determinación de compuestos volátiles | 32-33 |
| 5.15. Análisis estadístico | 33 |
| 6. Resultados | |
| 6.1. Aislamiento | 34 |
| 6.2. Preselección | 34-36 |
| 6.3. Selección de aislados productores de aminoácidos ramificados | |
| 6.3.1. Estandarización de condiciones de fermentación | 36-37 |
| 6.3.2. Selección de aislados | 38 |
| 6.3.3. Producción de aminoácidos en medio mineral | 38-39 |
| 6.3.4. Producción de aminoácidos en consorcios bacterianos ... | 39 |
| 6.4. Identificación de aislados | 43-45 |
| 6.5. Propiedades probióticas | |
| 6.5.1. Tolerancia a pH y bilis | 45-46 |
| 6.5.2. Crecimiento a diferentes pH, concentraciones de bilis y lisozima | 46 |
| 6.5.3. Actividad antimicrobiana | 50 |
| 6.5.4. Compatibilidad entre aislados y con cepas probióticas | 50-51 |
| 6.6. Potencial uso en alimentos lácteos fermentados | |
| 6.6.1 Cambio de pH y cinética de células viables | 51 |
| 6.6.2 Producción de compuestos volátiles | 51-52 |
| 7. Discusión | |
| 7.1. Identificación de cepas | 57 |
| 7.2. Producción de aminoácidos | 57-61 |
| 7.3. Potencial probiótico | 61-66 |
| 7.4. Potencial uso en alimentos fermentados | 66-68 |
| 8. Conclusión | 69 |
| 9. Perspectivas | 70 |
| 10. Referencias | 71-84 |
| 11. Apéndices | |
| Apéndice A | 85-86 |
| Apéndice B | 87-88 |
| Apéndice C | 89-90 |
| 12. Curriculum Vitae | 91-97 |
| 13. Declaración de Independencia | 98 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Página |
|------------------|---|---------------|
| Figura 1 | Vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada: isoleucina, valina y leucina en bacterias | 12 |
| Figura 2 | Diagrama simplificado de la función y regulación del sistema proteolítico de lactococci en hidrólisis de caseína | 13 |
| Figura 3 | Número de aislados obtenidos de muestras fecales de infantes lactantes procedentes de tres municipios del Estado de Guanajuato: Irapuato, Pueblo Nuevo y Dolores Hidalgo | 35 |
| Figura 4 | Análisis de conglomerados basado en el algoritmo de distancia promedio, generado a partir de los perfiles de sensibilidad a antibióticos de las cepas control (<i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>) | 36 |
| Figura 5 | Agrupación de aislados basado en los perfiles de sensibilidad a antibióticos. El análisis de conglomerados se realizó utilizando el algoritmo de distancia promedio para cada región de muestreo. a) Irapuato, b) Pueblo Nuevo, c) Dolores Hidalgo | 37 |
| Figura 6 | Diagrama de calor de perfiles de aminoácidos libres producidos por fermentación de medio MRS modificado, incubado bajo condiciones anaerobias, 37° C por 12, 24, 48, 72 y 96h por las cepas control empleadas en este estudio (<i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>) | 40 |
| Figura 7 | Producción de aminoácidos libres producidos en medio MRS modificado, fermentado bajo condiciones de anaerobiosis a 37° C por 48 h por los aislados seleccionados | 41 |
| Figura 8 | Producción de aminoácidos libres en fermentación de medio mineral bajo condiciones anaeróbicas a 37° C, a 24, 48 h y 72 h de fermentación por aislados seleccionados | 42 |
| Figura 9 | Producción de aminoácidos libres totales en leche descremada UHT fermentada bajo condiciones de anaerobiosis a 37° C por 24 y 72h, por consorcios microbianos formados por cepas control y aislados seleccionados | 43 |
| Figura 10 | Diagrama de calor de perfiles de aminoácidos producidos en fermentación de leche descremada UHT, incubada bajo condiciones anaerobias a 37° C por 24 y 72h, por consorcios microbianos formados por cepas control y aislados seleccionados | 44 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | Página |
|------------------|--|---------------|
| Figura 11 | Tolerancia a pH en solución de fosfatos pH 2.0 ajustado con HCl 1N de cepas control y aislados seleccionados, incubado bajo condiciones aeróbicas a 37 ° C por 90 y 180 minutos | 47 |
| Figura 12 | Tolerancia a bilis en solución de fosfatos al 1% y 3% de cepas control y aislados seleccionados, incubado bajo condiciones anaerobias a 37 °C por 4 y 8 h | 48 |
| Figura 13 | Crecimiento de aislados y cepas control en medio MRS a diferentes pH y concentraciones de bilis, incubado bajo condiciones anaeróbicas a 37°C por 24 horas | 49 |
| Figura 14 | Prueba de compatibilidad entre aislados y con cepas control. a), b), c) compatibilidad entre aislado 11J y cepas control. d) y e) compatibilidad del aislado 11J con los demás aislados productores de aminoácidos ramificados | 55 |
| Figura 15 | Fermentación de leche descremada por Consorcio M, incubado bajo condiciones de anaerobiosis, 37 °C por 24, 48 y 72 h. a) Cinética de células viables; b) Cambios de pH | 55 |
| Figura 16 | Mapa de calor de perfiles de volátiles producidos en fermentación de leche descremada por consorcio M, incubado bajo condiciones anaerobias a 37 °C por 24 y 48 h | 56 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | | Página |
|-----------------|---|--------|
| Tabla 1 | Principales cepas microbianas probióticas utilizadas en estudios experimentales | 2 |
| Tabla 2 | Distribución estimada de los mayores grupos y géneros bacterianos en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal | 6 |
| Tabla 3 | Composición de inóculo en consorcios probióticos formados por cepas control y aislados seleccionados productores de aminoácidos ramificados | 28 |
| Tabla 4 | Perfiles de sensibilidad a antibióticos de cepas control, determinados en Agar MRST bajo condiciones anaeróbicas a 37° C por 24 y 48 h | 35 |
| Tabla 5 | Identificación molecular y bioquímica de los aislados productores de aminoácidos ramificados | 46 |
| Tabla 6 | Tolerancia a lisozima en medio MRS por cepas control y aislados productores de aminoácidos ramificados incubados en anaerobiosis, 37 °C por 24 h | 50 |
| Tabla 7 | Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra <i>Shigella flexnerii</i> ATCC 12022 | 53 |
| Tabla 8 | Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra <i>S. choleraesuis</i> ATCC 10708 | 53 |
| Tabla 9 | Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra <i>S. enteritidis</i> ATCC 1045 | 53 |
| Tabla 10 | Contenido de principales ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de medio MRS bajo condiciones anaeróbicas, 37° C por 24 h | 54 |
| Tabla 11 | Compatibilidad entre aislados seleccionados y cepas control ... | 54 |

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Definición

La palabra “probiótico” deriva de las raíces griegas “pro” y “bios” que significan “a favor de la vida” en oposición a los “antibióticos” que significa “en contra de la vida” (Goktepe et al. 2006).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) en 2002, declararon que hay evidencia científica para indicar el potencial de los probióticos en beneficio de la salud y la existencia de cepas específicas de uso seguro para consumo humano. Estas organizaciones propusieron una definición, la cual es mundialmente aceptada y lo definen como: “microorganismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada confieren un beneficio en la salud del huésped”. Sin embargo, existe una definición más específica: “monocultivos o cultivos mixtos de microorganismos vivos, los cuales cuando son aplicados en humanos o animales ejercen un efecto benéfico en el huésped mejorando las propiedades de la flora autóctona” (Havenaar et al. 1992). En cuanto a la aplicación en alimentos los probióticos son definidos como: “preparaciones viables en alimentos o suplementos alimenticios que ejercen un efecto benéfico en la salud de humanos y animales” (Salminen et al. 1998).

1.2 Taxonomía y características generales de probióticos

Existe una gran diversidad de cepas probióticas disponibles en el mercado las cuales pueden ser administradas como alimentos fermentados y productos farmacéuticos (cápsulas o microencapsulados). La mayor parte de estas cepas pertenecen al grupo BAL, sin embargo, existen otras no incluidas dentro de este grupo. En la Tabla 1 se presentan las principales especies bacterianas, de las cuales algunas cepas probióticas se han utilizado en estudios experimentales (Gogineni et al 2013; Soccol et al. 2010; Varankovich et al. 2015).

Las BAL son un grupo de bacterias Gram positivas que comparten una serie de características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de las bacterias incluidas en el grupo son: Gram positivas, no formadoras de esporas, catalasa

negativa, cocos o bacilos, y producción de ácido láctico como el producto mayoritario de la fermentación de carbohidratos (Salmínen & Ouwehand 2004).

Tabla 1. Principales cepas microbianas probióticas utilizadas en estudios experimentales (Gogineni et al 2013; Soccol et al. 2010; Varankovich et al. 2015)

| Grupo o género | Especies |
|----------------|--|
| BAL | <i>Lactobacillus</i> <i>L. acidophilus, L. amylovorus, L. casei, L. delbruekii, L. reuteri, L. brevis, L. cellobiosus, L. curvatus, L. fermentum, L. plantarum, L. rhamnosus, L. salivarius, L. gasseri, L. johnsonii, L. helveticus, L. farciminis. L. paracasei</i> |
| | <i>Bifidobacterium</i> <i>B. bifidum, B. infantis, B. longum, B. thermophilum, B. adolescentis, B. lactis, B. animalis, B. breve, B. infantis.</i> |
| Otras BAL | <i>Sporolactobacillus inulinus, Streptococcus thermophilus, Lactococcus lactis, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, Pediococcus pentosaceus, Enterococcus durans, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Enterococcus lactis, Oenococcus oeni</i> |
| No BAL | <i>Bacillus clausii, Bacillus cereus, Bacillus pumilus, Bacillus indicus, Bacillus oligonitrophilis</i> <i>Escherichia coli</i> (Nissle) |

La taxonomía de BAL comprende dos Filos: Firmicutes y Actinobacteria. En el primero, las bacterias ácido lácticas están incluidas en la clase Bacilli, orden Lactobacillales e incluye los siguientes géneros: *Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* y *Weisella*, los cuales corresponden a organismos de bajo contenido de Guanina-Citocina (G-C, 31-49%) (Horvath et al. 2009). El segundo Filo cuenta con 5 subclases, 6 órdenes y 14 subórdenes. Con excepción de *Tropheryma whipplei*, se caracterizan por contener un alto contenido en G-C (55-67%). En este filo, el orden Bifidobacteriales contiene dos familias: Bifidobacteriaceae e Incertae. El primero se divide en cinco géneros: *Bifidobacterium, Aeriscardovia, Gardnerella, Parascardovia* y *Scardovia* (Lee & O'Sullivan, 2010).

Dentro de las BAL, los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* corresponden a los de mayor importancia desde el punto de vista clínico y tecnológico. El origen de estas bacterias es diverso, sin embargo, el género *Lactobacillus* presenta mayor adaptabilidad a diferentes hábitats, tales como: carne, vegetales, lácteos, cavidad bucal, vagina y tracto gastrointestinal (TGI). En contraste, el género *Bifidobacterium* está limitado a cavidad bucal, vagina y leche materna, así como TGI de animales e insectos (Schell et al. 2002; Sun et al. 2015).

Por otro lado, el género *Bacillus* comprende bacterias Gram positivas que se caracterizan por su crecimiento en condiciones aerobias y formación de esporas. Estas bacterias contienen un contenido bajo de G-C y están incluidas en el filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales y Familia Bacillaceae. La diversidad fenotípica por miembros de este género implica adaptaciones a condiciones extremas como: temperaturas y concentraciones de sal elevadas, condiciones ácidas y resistencia a sistema inmune de muchos animales por algunas de las cepas (Maughan & Van der Auwera 2011). Aunque el suelo es considerado su hábitat, este puede simplemente servir como reservorio pues se han determinado en tracto gastrointestinal de animales e insectos (Hong et al. 2009).

Finalmente, las Enterobacterias comprenden una familia de organismos que se caracterizan por ser Gram negativos, de morfología variable, no formadoras de esporas, anaerobios facultativos, oxidasa negativo, catalasa positivo y poseen capacidad de fermentación de carbohidratos con producción de ácidos orgánicos y gas (Baylis et al. 2011). Estudios filogenéticos las incluyen dentro del filo Proteobacterias, clase Gammaproteobacteria y Orden Enterobacteriales (Brenner et al. 2005). El Filo Proteobacterias está dividido en cinco clases: Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria y Epsilonproteobacteria, sin embargo, la división Gammaproteobacteria destaca del resto pues incluye géneros de importancia clínica, alimentaria y biotecnológica, tal como: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, entre otros (Yakoubou & Côté, 2010). Las enterobacterias se encuentran ampliamente distribuidas y algunas especies forman parte de la microflora del TGI de animales y del ser humano, sin embargo, pueden adaptarse y sobrevivir en otros hábitats como suelo, plantas, etc. (Baylis 2011).

1.3 Flora intestinal y probióticos

La microflora o microbiota es la comunidad microbiana que habita en las superficies mucosas de un individuo anfitrión, también llamado huésped. Cada individuo humano alberga unos 100 billones de bacterias y son clasificados en más de 50 géneros y miles de especies, representando nueve divisiones bacterianas y una arquea (Kurokawa et al. 2007).

La microbiota intestinal es relativamente estable en la edad adulta. Sin embargo, existen diversos factores relacionados al TGI, tales como: genotipo del huésped, dieta, edad, sexo, daño orgánico y fármacos (especialmente antibióticos), que pueden modular la composición de la misma (Nicholson et al. 2005). Se reporta que antes del nacimiento el feto adquiere microorganismos transferidos vía vaginal por la madre, de los cuales se ha detectado mediante análisis genético la presencia de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La presencia de estos microorganismos se relaciona a la predominancia de estos géneros durante el embarazo (Mueller et al. 2015). Sin embargo, al nacer el TGI es colonizado por bacterias anaerobias facultativas las cuales tienden a reducir el potencial redox, para la posterior implantación de anaerobios estrictos. Estudios metagenómicos y convencionales de cultivo demuestran que la flora de infantes es dominada por Bacteroidetes, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria y en menor proporción Cyanobacteria (Palmer et al. 2007). Otros estudios reportan la implantación inicial de diversos géneros bacterianos, tales como: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Routella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, y en menor proporción *Prevotella*, *Acinetobacter*, *Desulfovibrio*, *Veionella* y *Clostridium*. (Pantoja-Feliciano et al. 2013; Park et al. 2005; Rodríguez et al. 2015; Sepp et al. 2000).

Por otra parte, se reporta que la microbiota temprana adquirida por el infante sufre cambios cualitativos y cuantitativos, lo cual conduce a la adquisición de microorganismos que facilitan la utilización de componentes provenientes de alimentos sólidos en la etapa de ablactación. Esto induce al desarrollo de un microbioma de estructura similar al adulto a una edad aproximada del infante de 3 años (Mueller et al. 2015).

En adultos sanos, la microflora intestinal está dominada principalmente por los Filos Bacteroidetes, seguido por Firmicutes, Actinobacterias y en menor proporción Proteobacteria (Rajilic-Stojanovic et al. 2007). Otro estudio con resultados similares, reporta algunos

géneros dominantes y comprende: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Parabacteroides*, *Alistripes*, *Faecalibacterium*, *Oscillibacter* y *Gemella* (Segata et al. 2012). De acuerdo a Kurokawa et al. (2007), individuos saludables de diferentes edades (0.5- 45 años) reflejan una composición dominada por *Bacteroidetes*, seguido por géneros de la división Firmicutes como: *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* y *Bifidobacterium*. Sin embargo, en los infantes, *Bifidobacterium* y /o unos pocos géneros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales como: *Escherichia*, *Raoutella* y *Klebsiella* fueron los mayores constituyentes (Kurokawa et al. 2007). En contraste a estos estudios, Woodmansey (2007) reporta modificación de la flora intestinal en adultos mayores, donde hay un incremento en géneros bacterianos putrefactivos, tales como: *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, y reducción cualitativa y cuantitativa en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Estas últimas representando entre 0.6 y 0.7% respectivamente (Guarner et al. 2003).

Por otro lado, las condiciones ambientales generadas en las diferentes secciones del tracto gastrointestinal influyen significativamente en la composición de las comunidades bacterianas. En el estómago, el contenido de bacterias es de alrededor de 10^3 ufc/mL y es debido al pH bajo que resulta de la secreción del jugo gástrico. En intestino delgado, la concentración aumenta en una proporción de 10^4 - 10^8 ufc/mL como resultado de la neutralización del ácido clorhídrico con el bicarbonato procedente de las secreciones pancreáticas. En este punto, la comunidad bacteriana es seleccionada principalmente por las secreciones biliares, incrementando su número a lo largo de esta sección (duodeno, yeyuno e íleon). Finalmente, la población de microorganismos en el colon es mucho mayor, ya que alcanzan concentraciones de hasta 10^9 - 10^{12} UFC/mL, debido a las condiciones menos adversas y mayor disponibilidad de nutrientes (Guarner et al. 2003; Blaut et al. 2007). En la Tabla 2 se presenta la distribución estimada de los mayores grupos bacterianos en diferentes segmentos del tracto gastrointestinal.

Las situaciones patológicas del huésped implican cambios en la composición de la flora intestinal. Quin et al. (2010) reporta para individuos adultos saludables, con sobrepeso y obesidad, así como con síndrome de intestino inflamatorio los grupos dominantes son: Bacteroidetes, *Dorea/Eubacterium/Ruminococcus*, Bifidobacteria, Proteobacteria y Streptococci/Lactobacilli. Sin embargo, Turnbaugh et al. (2009), reporta para individuos

obesos una proporción mayor de Actinobacterias y menor de Bacteroidetes comparado con individuos delgados, sin diferencia en Firmicutes. Además demostraron que existe mayor similitud en microbioma entre individuos emparentados, siendo más similar entre gemelos homocigóticos, seguido por gemelos heterocigóticos, posteriormente con sus madres y finalmente con individuos no emparentados.

Tabla 2 Distribución estimada de los mayores grupos y géneros bacterianos en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal (Goktepe et al. 2006).

| Sección | Géneros bacterianos |
|----------------|--|
| Estómago | <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Streptococcus</i> . |
| Duodeno | <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> y <i>Lactobacillus</i> |
| Yeyuno e Íleon | <i>Actinomyces</i> , <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> ., <i>Lactobacillus</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Streptococcus</i> y <i>Veillonella</i> . |
| Colon | Incluye los géneros presentes en las secciones anteriores y además: <i>Bifidobacterium</i> , <i>Coprococcus cutactus</i> , <i>Eubacterium</i> , <i>Megamonas</i> , <i>Megasphaera</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Staphylococcus</i> . |

Otros estudios han determinado variaciones en la flora intestinal bajo ciertas condiciones patológicas. Larsen et al. (2010) reportan que en individuos con diabetes tipo 2 la abundancia relativa de Firmicutes fue significativamente menor, mientras que la proporción de Bacteroidetes y Proteobacteria fue mayor. La proporción de Bacteroidetes a Firmicutes estuvo relacionada con una reducida tolerancia a glucosa. Gupta et al. (2011) determinaron la composición de la microflora en niños sanos y desnutridos de 16 meses de edad. Para los primeros, el microbioma estuvo representado mayoritariamente por los siguientes órdenes: Lactobacillales, Enterobacteriales, Pseudomonadales, Chloroflexales, Xanthomonadales, Planctomycestaes, Halobacteriales, Burkholderiales, Actinomycetales, Bifidobacteriales, Desulfovibrionales and Rhizobiales. Para los segundos, la composición fue similar, sin embargo, las familias Campylobacteriaceae y Helicobacteriaceae fueron 35 y 12 veces más altas que para infantes sanos.

Adicionalmente, estudios basados en técnicas de cultivo han determinado que en patologías relacionadas con el intestino delgado como: síndrome de intestino irritable, pseudoobstrucción intestinal crónica, miopatía intestinal y dismotilidad presentaron diferencias respecto individuos sanos. Estas diferencias estuvieron representadas por

ausencia de las especies *Streptococcus intermedius* y *Haemophilus arahaemolyticus*, mayor contenido de *Veionella* (Sullivan et al. 2003).

1.4 Evaluación de los probióticos

En 2002 la OMS y FAO definieron las guías y estándares de calidad para evaluación de los probióticos, con lo cual avalan que este tipo de productos son seguros y efectivos para garantizar su aplicación en humanos. El informe comprende los siguientes puntos:

1. Identificación de cepa: determinar por métodos moleculares aceptados internacionalmente para establecer el fenotipo y genotipo, género y especie de acuerdo con el Código Internacional de Nomenclatura. Depositarse en una colección microbiana internacional.
2. Caracterización biológica: Demostrar el efecto benéfico de los microorganismos a través de pruebas *in vitro*, determinando las características de adhesión, actividad antimicrobiana, resistencia a bilis y pH ácido. Además, ensayos *in vivo* en modelos animales.
3. Seguridad: históricamente los datos indican que los probióticos administrados en alimentos o en comprimidos son seguros para uso humano. Sin embargo, la FAO y la OMS recomiendan que las cepas probióticas incluyan una serie de pruebas que demuestren su seguridad como resistencia a los antibióticos, producción de toxinas, actividad hemolítica, actividad metabólica y efectos adversos en el consumidor.
4. Eficacia: Comprobar en estudios clínicos (doble ciego, aleatorizados, placebo) el efecto esperado del probiótico en humanos.
5. Especificaciones: Definir en la etiqueta o documento las características del producto como género y especie, concentración del microorganismo, condiciones de almacenamiento y el efecto benéfico específico.

1.5 Mecanismos de acción y aplicaciones clínicas

De acuerdo a Castro & de Roberto (2006) y Hart et al. (2009), existen varios mecanismos de acción en la efectividad de los probióticos para mejorar la resistencia del huésped contra organismos patógenos entre ellas están: producción de sustancias antimicrobianas (ácidos de cadena corta, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas),

disminución del pH intestinal, competencia por sitios de adhesión a la mucosa intestinal, competencia por nutrientes y estímulo de la respuesta inmune (producción de inmunoglobulinas e interleucinas específicas y activando macrófagos). Estos mecanismos, hacen que este tipo de bacterias tengan una diversidad de aplicaciones clínicas, entre las que podemos mencionar: tratamiento de úlceras pépticas (Penner et al. 2005), infecciones por *Clostridium difficile* e incremento en la secreción de inmunoglobulinas IgA por células de la mucosa intestinal, tratamiento de alergias alimentarias (Kaur et al. 2002; De Vrese et al. 2007), cáncer colorrectal (Fortiadis et al. 2008; Castro & de Roberto 2006), entre otras.

En años recientes, la aplicación de probióticos se ha extendido a la aplicación de probióticos en pacientes en estado crítico, donde el estrés fisiológico ocasionado por el traumatismo genera alteraciones en el organismo, tales como: alteración hormonal, isquemia del TGI, inmunosupresión, translocación bacteriana y carencia de nutrientes. Jain et al. (2004) reporta un efecto favorable en la suplementación de un simbiótico (prebiótico + prebiótico) a base de cepas *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, reflejándose en una menor incidencia de bacterias patógenas. Otro estudio reporta el efecto positivo de la suplementación del simbiótico Symbiotic 2000 Forte, formulado a base de las cepas: *Pediococcus pentosaceus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* y *Lactobacillus plantarum*, adicionado beta-glucanas, inulina, pectina y almidón resistente. En este estudio, la suplementación en pacientes en estado crítico durante un período de 15 días, disminuyó la tasa de infección (27%), sepsis severa y mortalidad (8%) (Kotzampassi et al. 2006).

1.6 Microflora intestinal y síntesis de aminoácidos

El tracto gastrointestinal es el hábitat de una comunidad microbiana compleja, donde las bacterias son los microorganismos dominantes. Ésta es altamente diversa y dinámica, y resulta del balance entre la flora residente del huésped y el sistema de defensa innato. La actividad metabólica de esta comunidad microbiana afecta la salud y nutrición del huésped a través del metabolismo de los sustratos dietéticos y la interacción con el epitelio intestinal (Camilli & Bassler 2006).

Entre las diferentes reacciones bioquímicas de las cuales los microorganismos son capaces, se encuentra la producción de aminoácidos a partir de fuentes de nitrógeno

inorgánico y utilizando como fuente de energía los carbohidratos fermentables (Matteuzzi et al. 1998). De acuerdo a Torrallardona et al. (1996a) y Yeboah et al. (1996) la flora intestinal contribuye desde el punto de vista nutricional en el suministro de aminoácidos al huésped. En estos estudios el suministro de NH₄Cl y Urea etiquetados con ¹⁵N en la dieta del huésped, resultó en incremento de Lys en tejidos y fluidos corporales.

Por otra parte, la flora intestinal contribuye en la nutrición del huésped incrementando la biodisponibilidad de aminoácidos contenidos en la proteína de la dieta, mediante el aporte enzimático que contribuye a una mayor hidrólisis de la misma. Se reporta que el Yeyuno es la sección del intestino delgado con mayor capacidad de asimilación de aminoácidos. Sin embargo, el íleon mantiene esta capacidad aunque en menor medida (Guadichon et al. 1999). Se ha demostrado que en el contenido luminal de esta última sección se presenta una elevada actividad proteolítica debido a la acumulación de peptidasas de origen bacteriano y del huésped (Macfarlane et al. 1988, 1989).

1.7 Producción de aminoácidos por bacterias

Los aminoácidos presentan diversas características que los hacen aplicables a diferentes rubros, por ejemplo: como aditivos alimentarios, componentes farmacéuticos, suplementos alimenticios, cosméticos, etc. Esto ha ocasionado, que la demanda por este tipo de compuestos se incremente rápidamente al igual que la tecnología para su producción.

A la fecha, la mayor parte de los aminoácidos pueden ser tecnológicamente producidos por cuatro diferentes métodos: extracción de hidrolizados de proteínas, síntesis química, síntesis enzimática o fermentación. Sin embargo, a nivel industrial, el método que posee mayor ventaja para la producción de cada aminoácido en particular es seleccionado desde el punto de vista económico. Debido a esto, la mayor parte de los aminoácidos son sintetizados por procesos microbianos, principalmente fermentación (Ikeda 2003).

Existe en el mercado una gran diversidad de cepas bacterianas silvestres y manipuladas por ingeniería genética, que son aplicadas en procesos industriales de fermentación en la biosíntesis de diversos aminoácidos. Estas cepas se caracterizan por tener activas las vías de síntesis de los 20 aminoácidos estándar y sus factores de crecimiento. Entre estas tenemos los siguientes géneros: *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Mycobacterium*, *Escherichia*,

Serratia, *Bacillus*, *Methylobacillus*, entre otras (Hermann 2003; Satoshi et al. 2009; Hwan & Yup, 2010; Yakub et al. 2011).

Por otra parte, el uso de BAL en la biosíntesis de aminoácidos es limitado, pues presentan auxotrofías para diversos aminoácidos y factores de crecimiento (Altermann et al. 2005; Cai et al. 2009). Se reporta que la falta de actividad de estas vías se debe a mutaciones en los diferentes genes que intervienen, resultando en la pérdida de funcionalidad (Morishita et al. 1981). Algunos estudios reportan la capacidad de síntesis de aminoácidos por BAL, entre estos tenemos: glutamato (Zereian et al. 2012), glutamina (Molin et al. 2011), lisina y metionina (Odunfa et al. 2001), e isoleucina a partir del precursor DL- α -aminobutirato (Matteuzzi et al. 1976).

1.7.1 Producción de aminoácidos de cadena ramificada vía *de novo*

La biosíntesis de aminoácidos Ile y Leu es baja en cepas silvestres debido a los mecanismos de regulación, sin embargo, para el aminoácido Val se han reportado géneros bacterianos con esta capacidad, entre estos tenemos: *Aerobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Bacillus* y *Brevibacterium*. La eficiencia de producción de este aminoácido está influenciada por la proporción carbono:nitrógeno (100:4), así como por la presencia de ion hierro (Kinoshita & Nakayama 1978).

La biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina e isoleucina) en bacterias está bajo el control de dos operones: *ilv* y *leu*, los cuales en los diferentes géneros y especies bacterianas presentan variabilidad tanto en las isoenzimas presentes, como en el arreglo de los genes estructurales en los operones (Epelbaum et al. 1998; Garault et al. 2000; Moat et al. 2002). Las vías de síntesis de estos aminoácidos presentan cuatro enzimas en común, correspondientes al operon *ilv*: acetohidroxiácido sintasa con tres isoenzimas (*ilvBN*, *ilvGM*, *ilvIH*), acetohidroxiácido isomeroreductasa (*ilvC*), dihidroxiácido deshidratasa (*ilvD*) y aminotransferasa de amino ácidos ramificados (*ilvE*). Sin embargo, en la síntesis de Ile interviene una enzima adicional: treonina desaminasa (*ilvA*) y en la síntesis de Leu intervienen enzimas adicionales correspondientes al operon *leu*: α -isopropilmalato sintasa (*LeuA*), isopropilmalato deshidratasa (*LeuC* y *LeuD*) y β -isopropilmalato deshidrogenasa (*LeuB*) (Lawther y et al. 1987; Godon et al. 1993; Singh et al. 1995; Garault et al. 2000; Park et al. 2010). La síntesis de aminoácidos ramificados presenta dos mecanismos de inhibición;

inhibición negativa y por mecanismo de atenuación, el primero es dependiente de la concentración de los aminoácidos ramificados intracelulares y el segundo es dependiente de la concentración de ARNt de los mismos aminoácidos (Lawther et al. 1987). En la Fig. 1 se muestra la vía de síntesis de estos aminoácidos y los mecanismos de inhibición implicados en su síntesis.

1.7.2 Producción de aminoácidos vía sistema proteolítico

Las bacterias además de estar provistas con las vías de síntesis para los aminoácidos a partir de nitrógeno inorgánico, cuentan con un sistema proteolítico que se encarga de procesar fuentes de nitrógeno orgánicas para su asimilación y utilización en las funciones celulares.

Como ya se mencionó antes, las BAL presentan deficiencias en sus capacidades biosintéticas en diferentes aminoácidos, sin embargo, cuentan con un sistema proteolítico altamente desarrollado para satisfacer sus requerimientos nutricionales. Este sistema está provisto de proteinasas ancladas a pared o membrana celular, sistema de transporte de péptidos y peptidasas intracelulares. El proceso inicia con la hidrólisis de las proteínas por medio de las proteinasas extracelulares, seguida por la internalización de los oligopéptidos generados, los cuales finalmente son hidrolizados en aminoácidos libres. En la Fig. 2 se muestran un diagrama simplificado de la función y regulación del sistema proteolítico basado en lactococci para hidrólisis de caseína (Altermann et al. 2005; Cai et al. 2009; Kleerebezem et al. 2003; Sasaki et al. 1995).

Se han reportado diferentes proteinasas ancladas a pared o membrana celular en diferentes especies: PrtP (*Lactococcus Lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*), PrtH (*Lactobacillus helveticus*), PrtR (*Lactobacillus rhamnosus*), PrtS (*Streptococcus thermophilus*) y PrtB (*Lactobacillus bulgaricus*) (Savijovi et al. 2006). Sin embargo, la expresión de este tipo de enzimas es cepa específica y depende de la fuente de nitrógeno presente, siendo expresadas en presencia de proteína y baja disponibilidad de péptidos y aminoácidos (Azkarate-Peril et al. 2009; Laakson et al. 2011; Siragusa et al. 2014). Se ha reportado la variación en actividad proteolítica de proteinasas de diferentes cepas de *Lactococcus lactis* en hidrólisis de los componentes de la caseína (α_{s1} -K- y β -) (Mierau et al. 1997). Además, la capacidad de cepas *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus delbruekii*

ssp. bulgaricus y *Streptococcus thermophilus* en la proteólisis de otras proteína de la leche (α y β -lactoglobulinas) (Pescuma et al. 2007).

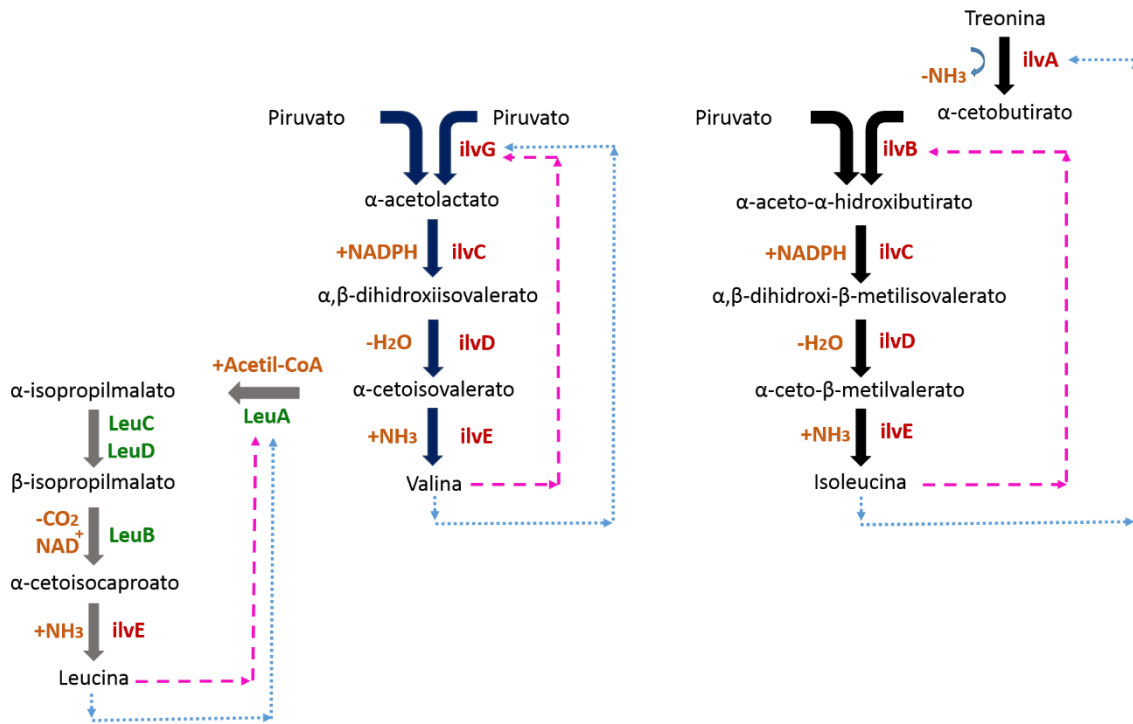


Figura 1. Vías de biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada: isoleucina, valina y leucina. La designación de las enzimas es como sigue: ilvA, treonina desaminasa; ilvB, acetohidroxiácido sintasa I; ilvG, acetohidroxiácido sintasa II; ilvC, acetohidroxiácido isómero reductasa; ilvD, dihidroxiácido deshidratasa; ilvE, aminotransferasa de aminoácidos ramificados; LeuA, α -isopropilmalato sintasa, LeuC y LeuD, isopropilmalato deshidratasa; LeuB, β -isopropilmalato deshidrogenasa. Las líneas punteadas en color azul indica inhibición negativa y las líneas punteadas en color rosa indican represión en expresión de enzima (Lawther y et al. 1987; Godon et al. 1993; Singh et al. 1995; Garault et al. 2000; Park et al. 2010).

Otro componente del sistema proteolítico son los transportadores de péptidos: Opp, Dpp y DtpT. Los dos primeros se clasifican dentro de la familia de transportadores ABC y están compuestos de cinco proteínas: una proteína de unión a oligopéptido (OppA), dos proteínas integrales de membrana (OppB y OppC) y dos proteínas de unión a nucleótido (OppD y OppF). El último se clasifica dentro de la familia PTR, que corresponde al transporte de péptidos acoplado a protones. La expresión de los transportadores es específica de cepa y estará influenciada por la composición del medio. Los transportadores Opp y Dpp se han determinado de manera general en BAL, el primero tiene capacidad de transportar péptidos

de hasta 18 residuos con baja afinidad para péptidos cortos, mientras que el segundo transporta di, tri y tetrapéptidos con mayor afinidad para tripéptidos que contienen aminoácidos ramificados. Finalmente, el transportador DtpT ha sido caracterizado en cepas de *Lactobacillus helveticus* y *Lactococcus lactis*, teniendo afinidad por di y tripéptidos que contienen al menos un aminoácido hidrofóbico (Fang et al. 2000; Savijoki et al. 2006).

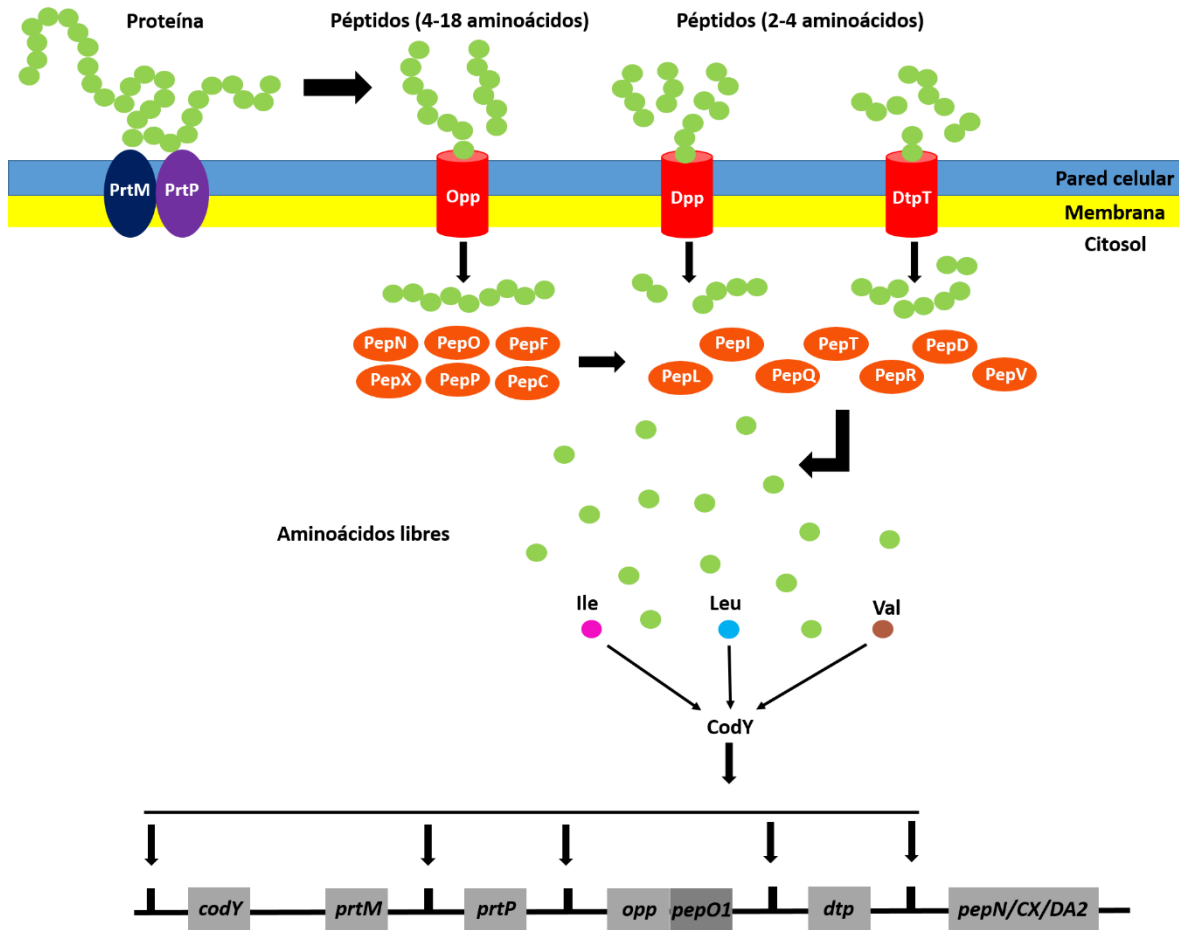


Figura 2. Diagrama simplificado de la función y regulación del sistema proteolítico de lactococi en hidrólisis de caseína. PrtP, proteinasa anclada a pared celular; PrtM lipoproteína de unión a membrana (madurasa de PrtP); Opp, permeasa de oligopéptidos; Dpp, transportador ABC para péptidos cortos; DtpP, transportador ligado a protones para péptidos cortos; PepO y PepF, endopeptidasas; PepN, PepC, PepP aminopeptidasas inespecíficas; PepX, X-propil depeptidil aminopéptidasa, PepT tripeptidasa, PepQ, prolidasa, PepR, prolinasa, PepI, iminopeptidasa de prolina; PepD y PepV dipeptidasas. El represor transcripcional CodY sensa el contenido de aminoácidos de cadena ramificada (Ile, Leu y

Val) y usando estos metabolitos como cofactores reprime el sistema proteolítico (Savijovi et al. 2006).

Por último, las peptidasas intracelulares de BAL son muy diversas y al igual que los otros componentes del sistema proteolítico su expresión es cepa específica. Dentro de estas se han caracterizado: endopeptidasas (PepE, PepE2, PepF, PepF1, PepF2, PepG, PepO, PepO2, PepO3), aminopeptidasas (Pep A, PepC, PepN, PepL, PepS), tripeptidasas (PepT), dipeptidasas (PepD, PepV) y peptidasas específicas de prolina (PepI, PepQ, PepR). Cada una de estas enzimas puede presentar variaciones en las diferentes cepas de BAL (Savijoki et al. 2006).

En bacterias Gram positivas el metabolismo nitrogenado es complejo y es regulado por diversos genes clave, dentro de los cuales el gen TnrA y CodY juegan un papel primordial. El primero es regulador transcripcional que modula la expresión de genes bajo condiciones limitadas en nitrógeno, mientras que el segundo lo hace en condiciones ricas en nitrógeno (Wray et al. 2001; Ratnayake-Lecamwasam 2001).

En *Bacillus subtilis*, el gen TnrA, regula la expresión de enzimas implicadas en el metabolismo de nitrógeno inorgánico, tales como: glutamino sintasa (*glnA*), asparaginasa (*ansB*), aspartasa (*AnsA*), ureasa (*ure*), γ -aminobutirato permeasa (*gabP*), enzimas asimilatorias de nitrato (*nasA* y *nasBCDEF*) y operon *nrgAB* (Wray et al. 1996).

Por otro lado, el gen CodY está implicado en la regulación de genes bajo condiciones ricas en nitrógeno orgánico (proteínas y péptidos), donde interviene el sistema proteolítico de la bacteria. De acuerdo a Den Hengst et al. 2005, los genes regulados por CodY en bacterias como *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis* presentan una o más secuencias denominadas caja CodY en la región promotora. En estas regiones localizadas río arriba del inicio de la transcripción son el sitio de unión del gen, que bajo condiciones ricas en nitrógeno (péptidos y aminoácidos) reprime la expresión de genes implicados en el sistema proteolítico, utilizando como cofactores los aminoácidos ramificados. En *Lactococcus lactis* los genes reprimidos por CodY bajo estas condiciones corresponden a proteinasas de pared celular, sistema de transporte de péptidos, peptidasas y algunos genes implicados en metabolismo de aminoácidos y ciclo de Krebs (Guédon et al. 2001; Marugg et al. 1995). De acuerdo a Meijer et al. (1996) la regulación de las péptidasas bajo las mismas condiciones es dependiente de

cepa. Además se reporta que el sistema proteolítico de otras BAL está menos estudiado y que algunos componentes del sistema no son regulados vía gen CodY (Mozzi, et al. 2010). Se ha demostrado que algunas peptidasas como PrtP, PrtM, Opp-PepO1, PepD, PepN, PepC, PepX son reprimidas a nivel transcripcional en *L. lactis* y PrtH, PrtR, en *L. helveticus* y *L. rhamnosus*, en medio rico en nitrógeno (péptidos) (Guédon et al. 2001a; Heber et al. 2000). Sin embargo, se reportan otras peptidasas como PepF, PepO1, PepC, PepP, PepR, PepQ, PepX, se regulan de manera independiente de CodY, siendo reguladas por factores como: contenido de oxígeno y carbohidratos fermentables (Savijoki et al. 2006).

El sistema proteolítico de las BAL presentan gran importancia desde el punto de vista tecnológico, pues sus capacidades metabólicas han sido aplicadas en la elaboración de productos lácteos fermentados, tales como: yogur, bebidas fermentadas a base de proteína láctea y diferentes tipos de quesos (frescos y madurados). En estos productos, la liberación de aminoácidos como resultado de la proteólisis sirven como precursores en la síntesis de compuestos que contribuyen al sabor y aroma (Bergamini et al. 2006, 2009; Beshkova et al. 1998; Burns et al. 2012; Crow et al. 2001; Iličić et al. 2012; Milesi et al. 2009; Ong et al. 2006; Settachaimongkon et al. 2014)

Al igual que las BAL, las Enterobacterias poseen la capacidad de hidrolizar péptidos para la obtención y utilización de aminoácidos como fuente de nitrógeno. La localización de las peptidasas en este tipo de bacterias incluye: espacio periplásmico, membrana interna y citoplasma. *E. coli* posee un gran número de enzimas proteolíticas, sin embargo, la función fisiológica de la mayoría de estas es desconocida (Miller et al. 1975; Maurizi 1992). En *E. coli* se han determinado peptidasas clasificadas como: dipeptidasas, aminopeptidasas, carboxipeptidasas y endopeptidasas, de las cuales se han identificado algunas peptidasas con capacidad de hidrolizar residuos de Leu (PepN, PepA, PepB y PepD).

En Enterobacterias se reporta un gen equivalente a CodY de las Gram positivas. Este gen denominado proteína reguladora en respuesta a Leu (*lrp*) está implicado en la regulación de varios genes del metabolismo nitrogenado, tales como: acetohixiacido síntasa (*ilv IH*), involucrada en biosíntesis de aminoácidos ramificados; operon *LeuABCD*, biosíntesis de Leu; operón *glnALG*, síntesis de glutamina; operón *gltBDF*, síntesis de glutamato; serina hidroximetil transferasa (*glyA*), síntesis de glicina, treonina desaminasa (*tdh*) catabolismo de

Thr; serina desaminasa (*sdaA*), catabolismo de Ser; proteína de unión al transportador de aminoácidos ramificados (*livJ*), transporte de Ile, Leu y Val; componentes del transportador de aminoácidos ramificados (*livKHMGEF*), transportador de Ile, Leu, Val; proteína de unión y componentes de transportador de oligopéptidos (*oppABCDF*), porinas de membrana extracelular (*ompC* y *ompF*). La regulación de este gen afecta de manera positiva o negativa la expresión de los genes u operones antes mencionados y este proceso será regulado por la disponibilidad de Leu en el medio (Calvo et al. 1994).

Se ha demostrado la actividad proteolítica extracelular de diferentes cepas de Enterobacterias en queso (Santos et al. 1996). Además, se reporta la expresión de proteasas con capacidad de hidrolizar los componentes de la caseína de la leche, mostrando mayor capacidad de hidrólisis para la fracción α_s , seguido por β y finalmente κ (Haddadi et al. 2005).

1.8 Importancia de aminoácidos ramificados en la nutrición humana

De los más de 300 aminoácidos que existen en la naturaleza, 20 corresponden a las unidades monoméricas de las proteínas predominantes. La unión de dos o más aminoácidos mediante enlace peptídico dará como resultado la formación de péptidos o proteínas, las cuales diferirán de acuerdo a la composición cualitativa y cuantitativa de sus unidades monoméricas (Murray et al. 2013).

Desde el punto de vista nutricional los aminoácidos son clasificados en esenciales y no esenciales. Los primeros, corresponden a aquellos que el organismo no puede sintetizar y por lo tanto deben ser ingeridos en los alimentos. Dentro de estos tenemos: Histidina (His), Isoleucina (Ile), Leucina (Leu), Lisina (Lys), Metionina (Met), Fenilalanina (Phe), Treonina (Thr), Triptofano (Trp) y Valina (Val). En contraste, los aminoácidos no esenciales son aquellos que el organismo puede sintetizar, y dentro de estos tenemos: Arginina (Arg), Alanina (Ala), Asparagina (Asn), Aspartato (Asp), Cisteína (Cys), Glutamato (Glu), Glutamina (Gln), Glicina (Gly), Prolina (Pro), Serina (Ser) y Tirosina (Tyr) (Reeds 2000).

Por otra parte, la fuente de aminoácidos proviene principalmente de la dieta, sin embargo, el aporte de cada uno de ellos dependerá de la calidad de proteína ingerida y está determinada por su digestibilidad y el contenido de aminoácidos esenciales en cantidades que corresponden a las necesidades del ser humano (FAO/OMS 2015). La disponibilidad de

los aminoácidos estará influenciada por la digestibilidad de las proteínas de la dieta y esto dependerá de su origen, donde una alta digestibilidad (95%) corresponde a proteína de origen animal como: leche, huevo y carne, dejando en segundo lugar la de origen vegetal como cereales y leguminosas (80-90%). La baja digestibilidad de esta última puede estar asociada a componentes adicionales de la planta (Tomé 2013). Se reporta que para animales monogástricos la asimilación de la proteína total ingerida oscila entre 80-90%, resultando en un % de este macronutriente no utilizable y disponible para el colon (Stein et al. 2007).

La digestión de las proteínas de la dieta inicia en el estómago por acción de la enzima pepsina, cuya actividad hidrolítica provoca la liberación de péptidos. Posteriormente los péptidos pasan al intestino delgado, donde las endopeptidasas (tripsina, quimiotripsina, elastasa) y exopeptidasas (carboxipeptidasas) provenientes de las secreciones del páncreas exócrino, convierten los oligopéptidos en aminoácidos libres, dipéptidos y tripéptidos. Estos son absorbidos en el intestino delgado, principalmente en duodeno y yeyuno, y en menor proporción en íleon (Dvorkin & Cardinali 2003). Del 30-50% de los aminoácidos esenciales procedentes de la dieta son oxidados por los enterocitos durante el proceso de digestión y absorción, dejando el resto a tejidos extraintestinales (Stoll & Burrin 2006). Además, la absorción de proteínas es alterada cuando disminuye la función pancreática en más del 90% (Dvorkin & Cardinali 2003).

El requerimiento de proteína en el ser humano debe incluir el nitrógeno necesario para la síntesis de proteínas, tanto tisulares como las involucradas con otras funciones; además, debe considerar cambios en la homeostasis como la oxidación de aminoácidos, producción y excreción de urea durante el día y el recambio proteico (Serralda-Zúñiga et al. 2003). La necesidad proteica se ha fijado en una cantidad segura para la mayoría de las personas en una población sana, sin embargo, existen factores como edad, peso, sexo, composición corporal, embarazo, lactancia y situaciones de estrés fisiológico que modifican la cantidad requerida (Arenas & Anaya 2007).

La ingesta deficiente en proteínas conduce a una serie de alteraciones fisiológicas, tales como: incremento de hormona glucocorticoides como consecuencia del estrés nutricional, dando como resultado proteólisis muscular (Jacobson 1999); absorción

deficiente de calcio intestinal y baja densidad ósea (Kerstetter et al. 2003); alteración en el desarrollo fetal (Schoknecht et al. 1993), entre otras.

Por otra parte, cuando el individuo se encuentra bajo situación de estrés fisiológico como resultado de un traumatismo (fractura, quemaduras, sepsis, daño orgánico, cáncer, VIH, entre otros), el organismo entra en estado fisiológico hipercatabólico como resultado de alteraciones hormonales, con incremento de hormonas glucagon, catecolaminas y glucocorticoides. Además, se presenta un incremento de citosinas proinflamatorias (IL-1, IL-2, FNT- α) por parte de células involucradas en el proceso inflamatorio (leucocitos y macrófagos). Esto trae como consecuencia una movilización de sustratos, donde la liberación de aminoácidos por proteólisis representa el principal mecanismo de obtención de energía vía gluconeogénesis (Arenas & Anaya 2007; Matarese & Gottschlich 2005). Se ha demostrado, que bajo situación de estrés fisiológico y ayuno prolongado los aminoácidos ramificados (Ile, Leu y Val) son los principales sustratos utilizados como fuente de energía por diversos tejidos (adiposo, hepático y muscular), provocando desgaste muscular (Castañeda 2002; Sowers 2009).

La importancia de los aminoácidos ramificados radica en que son los mayores constituyentes de la proteína muscular (14-18%), junto con la glutamina se encuentran en mayor concentración en sangre y en músculo en forma libre en concentraciones de 0.6-1.6mM y 0.3-0.4mM, respectivamente (Shimomura et al. 2006). Además, se reporta que la concentración en plasma de estos aminoácidos es afectada significativamente por cambios en la dieta por deficiente ingesta calórica y en macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas) (Adibi 1976).

De estos aminoácidos, el aminoácido Leu destaca en importancia por ser un metabolito clave en la regulación del metabolismo de proteínas musculares. La regulación de este proceso es complejo, sin embargo, se ha demostrado que está regulado por una proteína cinasa serina/treonina cuyo mecanismo es denominado blanco de rapamicina (mTOR). En células de mamíferos existen dos complejos multiproteicos estructural y funcionalmente diferentes: mTORC1 y mTORC2. El primero es el responsable de sensibilizar e integrar diversos indicadores nutricionales y ambientales, incluyendo factores de crecimiento, niveles de energía, estrés celular y aminoácidos. Este complejo está formado por las proteínas mTOR, Raptor, G β L y DEPTOR, y su mecanismo de acción

inicia con la activación de receptores acoplados a proteínas G, que inducen la producción de fosfatidilinositol trifosfato (PIP3) como segundo mensajero. Este lípido induce la fosforilación de la proteína cinasa PDK1, que junto con mTORC2 fosforilan la proteína cinasa Akt (proteína cinasa B), y una vez activada fosforila a mTORC1, para finalmente activa la proteína p70S6K (proteína ribosomal S6 cinasa) y 4E-BP1 (Proteína ligadora de 4E). La fosforilación de este último por Raptor/mTOR provoca la liberación de eIF-4E (factor iniciador de la traducción eucariótico 4E), dando como resultado la síntesis de proteínas. La inhibición de esta vía se lleva a cabo por la proteína PTEN que inhibe la activación de Akt por desfosforilación de PIP3, la cual induce expresión de proteínas inhibidoras en la vía en ausencia de estímulos, induciendo el catabolismo de proteínas (Bhaskar & Hay 2007; Pinzón et al. 2009; www.cellsignal.com 2015).

Por otra parte, el catabolismo de proteínas inicia con oxidación de aminoácidos ramificados en la mitocondria. El proceso inicia con la desanimación por medio de la enzima aminotransferasa de aminoácidos ramificados, que da como resultado α -cetoácidos de cadena ramificada. A continuación, estos ácidos sufren descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo enzimático deshidrogenasa de α -cetoácidos de cadena ramificada. El proceso está regulado por una cinasa que inactiva por fosforilación el complejo deshidrogenasa de aminoácidos ramificados y por una fosforilasa que lo activa. La activación o desactivación de este complejo y por lo tanto la dirección de la vía estará determinado por la disponibilidad de nutrientes en la célula (Shimomura et al. 2006). Además, se reporta en varios estudios que la suplementación del aminoácido Leu o su correspondiente α -cetoácido (β -hidroxi- β -metil butirato) induce la inactivación del complejo enzimático deshidrogenasa de α -ceto ácidos de cadena ramificada, induciendo la síntesis de proteína (Wilkinson et al. 2013).

El catabolismo de proteínas musculares trae como consecuencia la pérdida de masa magra en el organismo, que cuando no se lleva a cabo un tratamiento nutricional adecuado da como resultado una falla orgánica, seguida por falla multi-orgánica y finalmente la muerte. Entre las alteraciones provocadas por el catabolismo proteico durante estrés fisiológico tenemos: disminución de las proteínas viscerales, disminución de la capacidad de coagulación, alteraciones de la respuesta inmunitaria, alteraciones en el proceso de curación de heridas, alteraciones de la función intestinal, translocación de bacterias

intestinales, disminución de la función muscular. Además, en pacientes con estrés fisiológico disminuye la secreción de enzimas digestivas (Matarese & Gottschlich 2004).

Diversos estudios han evaluado el efecto de la suplementación de este aminoácido en determinadas condiciones fisiológicas, tales como: sepsis, trauma y pacientes quemados (De Brant & Cynober 2006), cáncer en situación de caquexia (Eley et al. 2007), anorexia en pacientes con hemodiálisis (Hiroshige et al. 2001), daño hepático y trasplante de hígado (Marchesini et al. 2005), insuficiencia respiratoria crónica (Menier et al. 2001). Todos estos estudios basados en la suplementación de Leu mostraron un efecto en la mejora del estado nutricional del paciente, reflejado en la modificación de su composición corporal como resultados de un incremento de masa magra.

Además, se ha demostrado que la suplementación de hidrolizado de proteína de suero de leche con 1.6% de Leu mejora la resistencia a insulina y estrés oxidativo, mediante el incremento de superóxido dismutasa y glutatión (Tong et al. 2014). Otro estudio reporta que la suplementación de Leu mejora la resistencia a insulina con reducción de tejido adiposo y preservación histomorfología y funcional de los islotes de Langerhans en dietas altas en grasa (Blinder et al. 2013). Finalmente, Ostadahimi et al. (2015) reportan disminución en el contenido de Hemoglobina glucosidada en sangre de pacientes con diabetes tipo 2, después de la ingesta de leche fermentada por cepas probióticas (*Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium*).

Existen en el mercado diversos productos de uso clínico o deportivo a base de aminoácidos ramificados (Levamin 80 CR, Levamin Normo; PISA), así como de sus cetoácidos precursores (Ketosteril, Fresenius Kabi), los cuales son empleados en la práctica clínica en el tratamiento de diversas patologías relacionadas a catabolismo de masa muscular, sin embargo, el costo de estos productos es elevado (>1000 pesos aminoácidos; 950 pesos ketosteril) y son poco accesibles para la mayor parte de la población. Basado en esto, este estudio se dirige al aislamiento, caracterización y evaluación de bacterias que solas o en combinación sean capaces de producir aminoácidos de cadena ramificada y que presenten un potencial probiótico adicional, con la finalidad de contribuir en el estado nutricional del paciente y evitando las complicaciones relacionadas al desgaste de la masa magra.

2. HIPÓTESIS

En el tracto gastrointestinal de infantes lactantes habitan bacterias con capacidad para producir aminoácidos ramificados y potencial probiótico.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Aislar, seleccionar y caracterizar bacterias procedentes de heces de infantes lactantes con capacidad para aminoácidos ramificados y potencial probiótico.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Aislar y seleccionar bacterias con capacidad de producir y/o secretar aminoácidos ramificados
- ❖ Seleccionar aislados de mayor producción
- ❖ Caracterizar bioquímica y molecularmente los aislados de mayor producción de aminoácidos ramificados.
- ❖ Evaluar propiedades probióticas de los aislados seleccionados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Microorganismos

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron como cepas control: *Lactobacillus acidophilus* ATCC4356, *Lactobacillus casei* ATCC393, *Lactobacillus paracasei* ATCC25302, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 53103, *Bifidobacterium adolescentis* ATCC 15703, *Bifidobacterium animalis* ATCC 27536, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y *Bifidobacterium infantis* ATCC15707. Estas cepas fueron proporcionadas por la Dra. Mercedes Guadalupe López Pérez, investigadora titular del Laboratorio de Química de Productos Naturales.

Para la prueba de actividad antimicrobiana se utilizaron las cepas patógenas Gram negativas: *Salmonella cholerasuis* ATCC 10708, *Salmonella enteritidis* ATCC 1045 y *Shigella flexnerii* ATCC 12022.

4.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Para las cepas control y aislados se empleó el medio De Man Rogosa and Sharpe (MRS; BD, USA) suplementado con 0.5% de tioglicolato de sodio (MRST) (Apéndice A). Las condiciones de crecimiento fueron anaerobiosis, 37° C y condiciones estáticas. Para medio sólido el tiempo de incubación fue de 48 h, mientras que para medio líquido fue hasta fase estacionaria (18 h). Estas condiciones serán llamadas durante el desarrollo del proyecto como condiciones estándar (CE).

Para las cepas patógenas, se empleó caldo nutritivo (Bioxon, USA; Apendice A) y Agar Mueller Hinton (BD, USA; Apendice A). La incubación se realizó bajo condiciones aeróbicas, 37° C por 18 h en condiciones de agitación.

4.3 Muestreo

El muestro se realizó en tres municipios del estado de Guanajuato: Irapuato, Dolores Hidalgo y Pueblo Nuevo. El primero situado a 101°20'48" de longitud oeste del meridiano de Greenwich y a los 20°40'18" de latitud norte, con una altura promedio sobre el nivel del mar (msnm) de 1730 m. El segundo teniendo como límites las coordenadas geográficas

100°37'18" y 101°11'03" de longitud oeste al meridiano de Greenwich y a los 20°50'12" y 21°21'54" de latitud norte, con un promedio de 1980 msnm. Finalmente, el municipio de Pueblo Nuevo localizado a 101° 22' 24" de longitud oeste al meridiano de Greenwich y a los 20° 31' 37" de latitud norte, con un promedio de 1706 msnm (www.guanajuato.gob.mx).

Las muestras consistieron de materia fecal recién depositada procedente de infantes lactantes, cuyos criterios de inclusión en el estudio fueron: alimentación exclusivamente de leche materna, estado nutricional saludable, edad entre uno y seis meses, ausencia de patologías relacionadas a tracto gastrointestinal (TGI) y no consumo de antibióticos por lo menos un mes antes al muestreo. Las muestras se colectaron bajo condiciones asépticas y transportadas en anaerobiosis a una temperatura de 4° C para ser procesadas en un lapso no mayor a 2 h.

4.4 Tratamiento de la muestra

Para cada muestra se realizó una serie de diluciones (10^1 a 10^6), partiendo de 1g y diluyendo en 9mL de agua peptonada (1% peptona, 0.85% NaCl; pH 7.0) adicionada con 0.5% de tioglicolato de sodio como agente reductor. Posteriormente, 50 μ L de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} fueron inoculadas por triplicado en Agar MRST (BD, USA) e incubadas a CE (Muñoz-Quezada et al. 2013).

4.5 Aislamiento

Posterior a la incubación, la selección de los aislados se basó en morfología macroscópica (morfología colonial) y microscópica (tinción Gram, morfología celular y agrupación), así como la prueba bioquímica catalasa. Para esta etapa, se tomaron como referencia las cepas control.

4.6 Purificación y conservación de los aislados

Los aislados seleccionados se purificaron mediante la técnica de estría en placa en dos ocasiones consecutivas incubando bajo CE. Su pureza se comprobó mediante tinción Gram. Posteriormente se inocularon 10 mL medio líquido MRST incubado a CE. De este cultivo se tomaron alícuotas de 1.5 mL, las cuales se centrifugaron a 6000 rpm por 5 min. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió al volumen inicial con medio líquido MRST al 30% (v/v) de glicerol. Por último, estos cultivos stock se sometieron a

congelación con nitrógeno líquido y fueron almacenados a -70°C para el uso en análisis posteriores.

4.7 Inóculo

Para todas las pruebas realizadas en este estudio se estandarizó el inóculo y las condiciones de inoculación, tanto de los aislados como de las cepas control. El procedimiento inició con la activación en dos ocasiones consecutivas de los cultivos stock. La primera activación consistió de la inoculación al 1% (v/v) del cultivo stock en 10 mL de medio líquido MRST incubado a CE. La segunda activación, consistió en la inoculación al 1% (v/v) partiendo del cultivo de la primera activación ajustado a una densidad óptica (D.O) de 0.7 a 600 nm e incubado a CE. Para la prueba de tolerancia a pH y bilis el inóculo no se ajustó.

4.8 Preselección de aislados

Debido al elevado número de aislados y a la similitud en las características macroscópicas y microscópicas, se procedió evaluar su sensibilidad frente a diferentes antibióticos con el fin de obtener diferencias en los perfiles y encontrar mayor variabilidad a nivel de cepas. Para esto, se empleó la técnica de resistencia a antibióticos por difusión en Agar, empleando el producto comercial Multidiscos Gram Positivos II (BIORAD). Este producto incluye los siguientes antibióticos: sulfametoxazol (SXT) 25 μg , ampicilina (AM) 10 μg , cefalotina (CF) 30 μg , cefotaxima (CTX) 30 μg , levofloxacin (LEV) 5 μg , cefepime (FEP) 30 μg , dicloxacilina (DC) 1 μg , eritromicina (E) 15 μg , gentamicina (GE) 10 μg , cefuroxina (CXM) 30 μg , penicilina (PE) 10 U y tetraciclina (TE) 30 μg .

El procedimiento inició con la dilución 1:10 del inóculo tanto de aislados como de cepas control. A continuación, 100 μL se inocularon en Agar MRST y se dispersaron en la superficie hasta su absorción total. Posteriormente, se colocó el multidisco sobre la superficie, dejando reposar por un tiempo de 20 minutos a 4°C . Los diámetros de las zonas de inhibición se midieron en mm con ayuda de un vernier después de la incubación a CE. Los valores obtenidos se expresaron en términos de resistencia (R) y susceptibilidad (S), tomando como referencia los valores de las cepas control sometidas a las mismas condiciones (Cueto-Vigil & Acuña-Monsalve 2010; Goderska & Czarnecki 2007).

4.9 Selección de aislados

4.9.1 Fermentación

4.9.1.1 Estandarización de condiciones

La selección de los aislados se basó en la capacidad de producción de aminoácidos ramificados libres mediante el proceso de fermentación. Para esto, se procedió a estandarizar las condiciones utilizando las siguientes cepas control: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus*, *B. animalis* y *B. breve*. Se inocularon 250 mL de medio líquido MRS modificado (se reemplazó proteosa peptona por peptona de caseína) (Apéndice A) y se esterilizó por filtración utilizando el sistema millipore (Merk Millipore, USA) con el uso de una membrana de 0.25 μm (Merk Millipore, USA). El inóculo se lavó previamente en dos ocasiones consecutivas con solución de fosfatos pH 7.0. Posteriormente, se procedió a la estandarización del tiempo de fermentación, dejando transcurrir el proceso por 48 h bajo condiciones anaerobias y 37° C, con toma de muestra a 12, 24, 48, 72 y 96 h. El experimento fue realizado por triplicado y en cada muestreo se cuantificó el contenido de aminoácidos libres.

4.9.1.2 Condiciones de fermentación de aislados

De acuerdo a los resultados obtenidos en la etapa de estandarización se eligieron como cepas control *L. rhamnosus* y *B. animalis*, el primero como control negativo y el segundo como positivo. Las condiciones de fermentación de los aislados fueron las siguientes: se inocularon 250 mL de medio MRS modificado estéril, preparado e incubado bajo las mismas condiciones que las cepas control. El tiempo de fermentación fue de 48 h, con toma de muestra al final de proceso. El experimento fue realizado por triplicado y se cuantificó el contenido de aminoácidos libres finales. Un total de 120 aislados fueron evaluados, los cuales resultaron de la elección en la etapa de preselección.

4.9.1.3 Determinación de aminoácidos libres

Los aminoácidos libres fueron cuantificados a partir del sobrenadante libre de células de las muestras fermentadas y de medio sin fermentar (control). El proceso inició con la centrifugación de las muestras a 8000 x g durante 5 min. para la eliminación del paquete celular (muestras fermentadas). Posteriormente se adicionó un volumen igual de acetonitrilo

(Sigma, USA), mezclando y dejando reposar durante 12 h a 4 °C. A continuación, se centrifugó a 13000 x g durante 5 min. para remoción de proteínas y extracción de aminoácidos libres, como describe Aristoy & Toldrá (1995). Una vez obtenido el sobrenadante, se congeló con nitrógeno líquido y se liofilizó. El extracto seco se resuspendió en agua ultra pura al volumen inicial de la muestra (1 mL) y se analizó mediante HPLC, donde se prederivatizó con solución de fenilisotiocianato (etanol-trietanolamina-agua-fenilisotiocianato, 7:1:1:1). Los derivados de fenilisotiocianato-aminoácidos libres generados fueron cuantificados como describe Bidlingmeyer et al. (1984). El contenido de aminoácidos fue evaluado usando un cromatógrafo Agilent Technologies 1200 acoplado a un detector de UV. La columna usada fue C-18 Pico-Tag (empacada en 3.9 x 150 mm, 5 µm de tamaño de partícula; Waters, USA). Las condiciones de operación fueron las siguientes: una velocidad de flujo de 1.0 mL/min, solvente A, ácido acético 0.14M, pH 6.51 en agua ultra pura; solvente B, acetonitrilo en agua ultra pura (60:20 v/v). Todos los solventes empleados fueron grado HPLC (Sigma, USA). La elución se realizó usando 96% de A y 4% de B por 10 minutos. Después de esto, se programó un paso de lavado con 100% de B. El volumen de inyección fue de 4 µL de muestra derivatizada. Se utilizó como estándar: H- standard (Waters, USA). Adicionalmente, triptófano, asparagina y glutamina se calibraron por separado. Se registró la absorbancia generada a una longitud de onda de 240 nm y el promedio de tres experimentos independientes se expresó en mg/L.

4.10 Producción de aminoácidos en medio mineral por aislados seleccionados

Una vez seleccionado los aislados productores de aminoácidos, se procedió a realizar la fermentación en medio mineral (Apéndice A), con la finalidad de determinar si la producción de aminoácidos era el resultado de síntesis *de novo* o hidrólisis de los péptidos del medio MRS. Para esto, se siguió el mismo procedimiento que para la sección 5.9.1.1. El tiempo de fermentación fue de 72 h, con toma de muestra a 24, 48 y 72 h. La determinación de aminoácidos se realizó de acuerdo a la sección 5.9.1.3.

4.11 Producción de aminoácidos en fermentación de leche en consorcios probióticos.

Los aislados seleccionados fueron sometidos a fermentación de leche descremada ultra pasteurizada (UHT) en consorcios cepas control. Para esta prueba, las cepas control incluidas fueron: *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. paracasei*, *L. rhamnosus* y *B. animalis*. La cepa

L. acidophilus fue elegida como una de las cepas clave en la formación de los consorcios, ya que a diferencia de las demás presentó capacidad de crecer en leche. La composición de los consorcios se muestra en la Tabla 1. Las condiciones de inoculación y fermentación fueron similares a la sección 5.9.1.2., sin embargo, el volumen de inóculo estuvo distribuido en proporciones iguales entre las cepas que lo integraron. El tiempo de fermentación fue de 72 h con toma de muestra a 24 y 72 h. El experimento se realizó por triplicado y en cada muestreo se determinó el contenido de aminoácidos libres de acuerdo a la sección 5.9.1.3. Los resultados representan el valor promedio \pm desviación estándar y son expresados en mg/L de leche fermentada.

4.12 Identificación de aislados

4.12.1 Identificación molecular

4.12.1.1 Amplificación del gen ribosomal 16S rRNA

La caracterización molecular de los aislados se realizó mediante la amplificación del gen ribosomal 16S rRNA, de acuerdo a Desgarenes et al. (2014). Para esto, se inició con la extracción de ADN y amplificación completa del gen 16S rRNA mediante la técnica de Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) mediante el uso de los primers F27 y R1494. Posteriormente, los productos resultantes fueron ligados al vector pJET 1.2 (Thermo scientific) y transformado en células competentes *Escherichia coli* DH5 α , siguiendo el protocolo del fabricante. A continuación, con la suspensión bacteriana se realizó una serie de diluciones y se sembraron en Agar Luria Bertani (LB) adicionado con 100 mg/L de ampicilina, dejando incubar bajo condiciones aeróbicas a 37° C, en agitación por 12-16 h. Para cada aislado se seleccionaron al azar 10 colonias para corroborar la presencia del plásmido con el inserto, siguiendo el procedimiento establecido por el fabricante. Finalmente, se realizó la extracción del inserto mediante la digestión del ADN plasmídico. Se secuenció por el método Sanger y las secuencias obtenidas fueron comparadas con las bases de datos no redundante de Genbank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Las secuencias fueron depositadas en GenBank con números de acceso: KY229764-KY229768 para 11J, 34J, 43J, 35F y 35H respectivamente.

Tabla 3. Composición de inóculo en consorcios probióticos formados por cepas control y aislados seleccionados productores de aminoácidos ramificados.

| Consortio | Cepas |
|-----------|---|
| A | <i>L. acidophilus</i> |
| B | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> |
| C | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> |
| D | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. animalis</i> |
| E* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 11J |
| F* | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 11J |
| G* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 34J |
| H* | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 34J |
| I* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 43J |
| J* | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 43J |
| K* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 35F |
| L* | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 35F |
| M* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 35H |
| N* | <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 35H |
| O* | <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , 11J, 34J, 43J, 35F, 35H |
| P* | <i>L. acidophilus</i> , <i>B. animalis</i> , 35H |

*Indica consorcios microbianos en los cuales fue incluido al menos un aislado seleccionado.

4.12.1.2 Determinación del perfil lipídico celular

La caracterización basada en perfiles de ácidos grasos fue realizada por The Food and Environment Research Agency, (Sand Hutton, York. YO41 1LZ, U.K, e-mail: plantclinic@fera.gsi.gov.uk). La determinación se realizó basado en los protocolos estandarizados en su laboratorio y la información obtenida se comparó con bases de datos públicas (TSBA. 10 library), de las cuales se proporcionó el resultado final de la identificación.

4.12.2 Identificación bioquímica

La caracterización bioquímica se realizó mediante el sistema Biolog (MicroLog system, Release 4.0, USA), el cual se basa en la caracterización de microorganismos de

acuerdo a su capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono. Las fuentes de carbono y las condiciones de crecimiento son específicas para el tipo de microorganismo estudiado. Todo los reactivos y materiales empleados en esta técnica fueron adquiridos del fabricante. Se siguió el procedimiento establecido por el fabricante, el cual inició con la siembra de los aislados en medio de cultivo sólido (Biolog Universal Growth, BUG), incubado a 35-37° C, en condiciones aeróbicas por 16-24 h. Posteriormente, la preparación del inóculo se realizó a partir de las colonias desarrolladas en BUG. Para esto, con ayuda de un aza bacteriológica se tomó parte de la superficie de la colonia y se diluyó en fluido inoculante específico para bacilos Gram negativos entéricos, adicionado con tioglicolato (GN/GP-IF+T). La suspensión bacteriana se homogenizó y la densidad bacteriana se ajustó a 63% de transmitancia (T). A continuación, en un tiempo no mayor a 20-30 minutos, la suspensión bacteriana se inoculó en cajas GN2 Microplate (Apéndice B), a un volumen de 150 μ L por pozo. Posteriormente, se incubó bajo condiciones aeróbicas a 35-37°C a 16-24 h. Finalmente se sometió al lector Biolog MicroStation™ System, el cual mediante la comparación del perfil obtenido con los disponibles en la base de datos Gram-negativos (GN) proporciona la identificación de la cepa evaluada. La identificación se realizó por duplicado para cada aislado.

4.13 Propiedades probióticas

4.13.1 Tolerancia a pH y bilis

A partir de un cultivo fresco en fase estacionaria de las cepas control y de los aislados seleccionados, se tomaron 2 mL y se lavaron en dos ocasiones consecutivas con solución salina de fosfatos pH 7.0. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 x g durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Para la prueba de tolerancia a pH, el paquete celular se resuspendió al mismo volumen (2 mL) en solución de fosfatos pH 2.0 ajustado con HCl 1N y se incubó bajo condiciones aeróbicas at 37° C. Se determinó el contenido de células viables a 0, 90 y 180 minutos de exposición. Para tolerancia a bilis, el paquete celular se resuspendió al mismo volumen (2 mL) en solución de fosfatos pH 5.8 al 1.0 y 3.0% (w/v) de bilis deshidratada (oxgall; BD Difco, USA). Los conteos de células viables en esta prueba fueron determinados a 0, 4 y 8 h de incubación bajo condiciones anaerobias y 37° C. Las células viables en ambos experimentos fueron determinadas por siembra en agar MRS incubado bajo CE. Como

control, el paquete celular se resuspendió en solución de fosfatos pH 7.0, incubado bajo condiciones y tiempo final específico de cada prueba. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los valores reportados representan las medias \pm desviación estándar (Sahadera et al. 2011).

4.13.2 Crecimiento a pH ácido, bilis y lisozima

Se determinó el efecto de pH ácido, bilis y lisozima en el crecimiento bacteriano de cepas control y aislados. Para las tres pruebas se inocularon 10 mL de medio MRS modificado de acuerdo a la prueba e incubado bajo condiciones anaerobias a 37° C por 24 h. Para pH el medio se ajustó a pH 3, 4, 5 y 6.5 con HCl 1N. Para bilis el medio se ajustó a una concentración final 0.3, 0.7, 1.0 y 3.0% (p/v) de bilis (oxgall; BD Difco, USA) y un pH final de 6.5. Finalmente para lisozima el medio se ajustó a una concentración final de 300, 500 y 700 μ g/mL. Como control se utilizó el medio sin modificar. Posterior a la incubación, para la prueba de pH se hizo conteo de células viables, mientras que para bilis y lisozima el crecimiento se determinó de manera indirecta mediante medición de densidad óptica a 600 nm. Los experimentos fueron realizados por triplicado y los valores reportados representan las medias \pm desviación estándar (Al-Saleh et al. 2006; Hoque et al. 2010).

4.13.3 Actividad antibacteriana

Para la prueba de inhibición bacteriana, se usaron las cepas patógenas Gram negativas: *S. choleraesuis* ATCC 10708, *S. enteritidis* ATCC 1045 and *S. flexnerii* ATCC 12022. El experimento partió de un cultivo en fase estacionaria de las cepas patógenas, las cuales fueron inoculadas al 1% en Agar Mueller Hinton previamente esterilizado y enfriado a 45-50° C. Después de mezclar vigorosamente, volúmenes de 25 mL de suspensión bacteriana se colocaron en placas de Petri de 100 mm de diámetro, dejando reposar hasta solidificar y realizando cuatro pozos de 9 mm de diámetro por placa de agar.

Por otro lado, cultivos en fase estacionaria de cepas control y de aislados seleccionados fueron centrifugados a 12000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante libre de células (SLC) se dividió en dos partes: una fue neutralizada con NaOH 5 M y la otra se mantuvo al pH generado por fermentación. Ambas muestras fueron esterilizadas por filtración empleando una membrana 0.25 μ m (Merk Millipore, USA). Posteriormente,

volúmenes de 50, 100, 150, 200, 250 y 300 μL de cada sobrenadante fueron adicionados a los pozos en las cajas petri inoculadas por las cepas patógenas. Como control se usó medio MRS pH 6.5. Las cajas de Petri fueron colocadas a 4 °C durante dos horas y posteriormente fueron incubadas en condiciones aeróbicas a 37 °C durante 24 h. Después de este tiempo se midieron las zonas de inhibición con la ayuda de un vernier y los resultados fueron expresados en mm. El experimento se realizó por triplicado y se reportó el promedio \pm desviación estándar (Vinderola et al. 2008).

4.13.4 Compatibilidad entre aislados y con cepas probióticas

La prueba de compatibilidad entre cepas se realizó de acuerdo a Ismail et al. (2016), la cual consistió en un ensayo por gota. El procedimiento inició con el vaciado de 25 mL de agar MRS suave (0.7 % w/v de agar) previamente inoculado al 1% de cultivo en fase estacionaria de aislado. Después de la solidificación del medio, otra cepa (aislados y cepas control) fue inoculada en la superficie con gotas de 5 μL de cultivo en fase estacionaria. Las placas se mantuvieron a 4 °C hasta la absorción de las gotas y posteriormente fueron incubadas bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C por 24 y 48 h. Después de la incubación, se registraron las zonas de inhibición. El experimento fue realizado por triplicado y los resultados fueron cualitativos, expresados el efecto antagónico mediante una escala hedónica de cuatro niveles: > 25 mm inhibición muy fuerte (++++), 15 to 25 mm inhibición fuerte (+++), 7 to 15 mm inhibición moderada (++) y <7 mm (+) inhibición débil.

4.14 Potencial aplicación del consorcio M en alimentos lácteos fermentados

Se procedió a evaluar la potencial aplicación en la producción de alimentos fermentados al consorcio de mayor producción de aminoácidos ramificados (Consortio M). Esto se llevó a cabo determinando el perfil de acidificación mediante la medición de cambios de pH y la viabilidad celular de las cepas que lo integran, así como la producción de compuestos volátiles. Los procedimientos se describen a continuación:

4.14.1 Cambio de pH y células viables

Se tomaron muestras de 1 mL de leche fermentada por el consorcio M a 0, 24, 48 y 72 h, y se procedió a determinar el pH y la viabilidad celular de las cepas integradoras del consorcio. El pH se determinó mediante el empleo de un electrodo, mientras que la viabilidad

celular se determinó disolviendo la muestra en 9 mL de solución de fosfatos pH 7.0 con agitación por 30 s. Posteriormente se realizó una serie de diluciones (10^{-1} a 10^{-6}), de las cuales se inoculó y distribuyó por la técnica de superficie 0.1 mL de cada una de ellas. Para la determinación del aislado seleccionado (*K. variicola*) se utilizó Agar MacConckey (BD, USA) y para las cepas de *Lactobacillus* se utilizó Agar MRS (BD, USA). La determinación de la viabilidad de las cepas de *Lactobacillus* se realizó considerando a *L. acidophilus* separado del grupo *L. casei* (*L. casei*, *L. paracasei* y *L. rhamnosus*) debido a la similitud en morfología macroscópica de estas últimas. Las condiciones de incubación se realizó bajo condiciones anaeróbicas a 37° C. Para *K. variicola* el tiempo de incubación fue de 24 h, mientras que para las cepas de *Lactobacillus* fue de 48 h. El experimento fue realizado por triplicado y los resultados expresan el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

4.14.2 Determinación de compuestos volátiles por técnica de Micro Extracción en Fase Sólida (MEFS)

Los compuestos volátiles fueron determinados de acuerdo a Alonso y Fraga (2001) con algunas modificaciones. De las muestras fermentadas se tomaron 10 g y fueron colocadas en viales con cierre hermético, a las cuales se añadió 10 g de sulfato de sodio anhidro (Sigma, USA) y se sometieron a calentamiento a baño maría a temperatura de 70° C por 15 minutos. Como controles se tomaron tres productos comerciales (Yogurt Oikos, Quesos Emmental y Gouda). Para el yogur se siguió el mismo procedimiento que para las muestras en estudio, mientras que para los quesos se procedió a pesar 12 g de muestra y se homogeneizó en 100 mL de agua estéril ultrapura y posteriormente recibieron el mismo tratamiento que las demás muestras. A continuación las muestras se mantuvieron a temperatura de 40° C durante 15 minutos y se insertó una fibra compuesta de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano de 2 cm de longitud mediante una jeringa de MEFS. Las muestras fueron analizadas mediante un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A series) acoplado a un detector selectivo de masas por ionización con impacto de electrones (Agilent Technologies 5975 series). Antes de cada determinación la fibra se desorbió por 20 minutos a 230° C. Las mediciones se realizaron por triplicado en tres experimentos independientes. Los parámetros del cromatógrafo de gases fueron ajustados para obtener la mejor resolución de los analitos.

Dentro de estos, la temperatura de inyección fue de 230° C y se usó el modo splitless. La temperatura inicial del horno fue de 40° C y se mantuvo durante 3 minutos, entonces se incrementó a 160° C a una velocidad de 6° C/min. A continuación se aplicó una segunda rampa de 10° C/min hasta llegar a una temperatura de 240° C. Para la determinación se utilizó una columna capilar ultra inerte J&W DB-1MS (60 m x 25 mm x 0.25 µm). El espectrómetro de masas (MS) por impacto de electrones fue operado en modo automático, con un rango de 25 and 450 of m/z. Las temperaturas de la fuente del MS y del cuadrupolo fueron 230 y 150°C respectivamente. La energía de colisión fue de 70 eV. La información se obtuvo mediante el software Mass Hunter (Agilent Technologies, Inc.). El análisis de la información se realizó mediante un software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS). Para la identificación de los compuestos se usó el software Mass Spectra Library y base de datos NIST MS Search version 2.0 (National Institute of Standards and Technology, 2008). Los resultados se expresaron en área relativa (AR).

4.15 Análisis estadístico

Todos los resultados son expresados como los valores promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. En todos los análisis se evaluó la normalidad de datos mediante la prueba de Shapiro y la homogeneidad de varianzas mediante la prueba de Levene. Cumplidas estas pruebas satisfactoriamente, el análisis de datos se realizó mediante la prueba paramétrica de Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía, y las diferencias significativas a $P < 0.05$ se identificaron mediante la prueba de Turkey, usando R Core Team software (2013).

5. RESULTADOS

5.1 Aislamiento

Se obtuvo un total de 344 aislados procedentes de 12 muestras colectadas en los tres municipios en estudio. La distribución y procedencia de los aislados es la siguiente: del municipio de Irapuato se obtuvo un total de 200 aislados (58.1%) correspondientes a 8 muestras, mientras que de los municipios faltantes se colectaron 2 muestras en cada uno. Para Pueblo Nuevo y Dolores Hidalgo, se obtuvo un total de 72 (20.9%) y 74 (21%) aislados respectivamente (Fig. 3).

5.2 Preselección

Para la preselección se tomaron como referencia los perfiles generados por las cepas control (Tabla 4). De los valores obtenidos, se establecieron criterios subjetivos de sensibilidad y resistencia, para lo cual se estableció como sensible un diámetro mayor a 20 mm y resistente un diámetro menor al mismo. Con estos datos, se procedió a realizar un análisis de conglomerados con la finalidad de agrupar perfiles similares y mostrar diferencias entre cepas. Para esto se utilizó el algoritmo de distancia promedio, el cual permitió establecer diferencias adicionales entre cepas cuyas características macro y microscópicas son similares, dando como resultado dos clados principales, el primero integrado *L. rhamnosus* y *B. animalis*, y el segundo representado por las cepas faltantes en tres niveles de distancia (Fig. 4).

Por otra parte, una vez aplicado el algoritmo a los perfiles generados por los aislados evaluados, se obtuvo un total de 102 agrupaciones diferentes. La distribución de estos grupos fue la siguiente: Irapuato con 63, Pueblo Nuevo con 18 y Dolores Hidalgo con 21 (Fig.5a, b, c). Algunos de los grupos estuvieron representados por un solo aislado, mientras que otros estuvieron integrados por varios. De los grupos formados por 2 o más, la elección fue de un aislado al azar, mientras que todos los aislados agrupados individualmente fueron incluidos en el estudio. Las cepas control fueron incluidas en el análisis, agrupándose por separado a todos los aislados (Fig. 5a). Este análisis resultó ser apropiado para resaltar diferencias adicionales entre aislados procedentes de la misma muestra y región, cuyas características

macro y microscópicas fueron similares, resultando de gran utilidad para reducir el tamaño de muestra a evaluar en la etapa de selección.

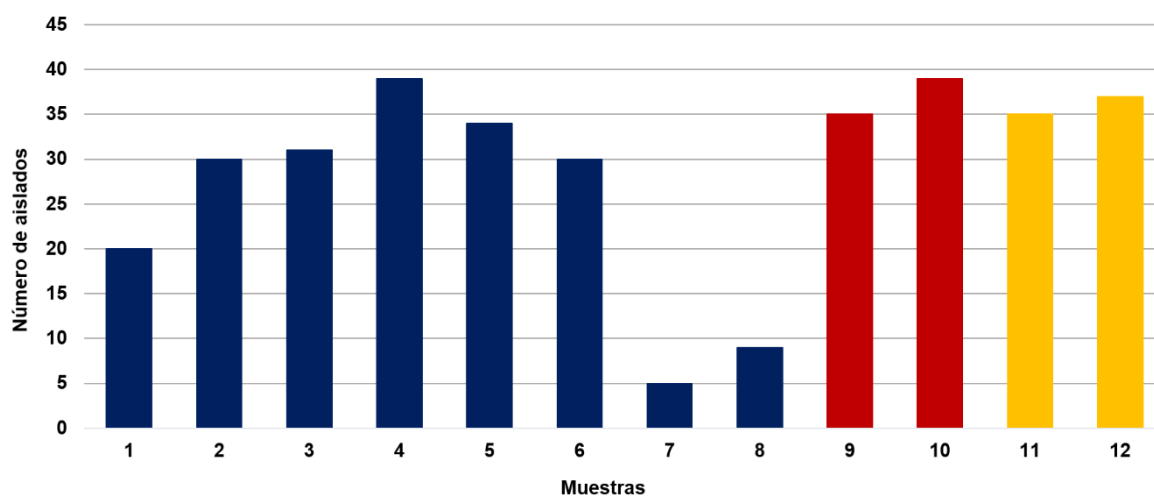


Figura 3. Número de aislados obtenidos de muestras fecales de infantes lactantes procedentes de tres municipios del Estado de Guanajuato. (■) Irapuato, (■) Pueblo Nuevo, (■) Dolores Hidalgo.

Tabla 4 Perfiles de sensibilidad a antibióticos de cepas control, determinados en Agar MRST bajo condiciones anaeróbicas a 37° C por 24 y 48 h.

| Cepa | Diámetro (mm) | | | | | | | | | | | |
|------|---------------|----|----|-----|-----|-----|----|---|----|-----|----|----|
| | SXT | AM | CF | CTX | LEV | FEP | DC | E | GE | CXM | PE | TE |
| LA | R | S | S | S | R | S | R | S | R | S | R | S |
| LC | R | S | S | S | S | R | R | S | R | S | R | S |
| LP | R | S | S | S | S | R | R | S | R | S | R | S |
| LR | R | S | R | R | S | R | R | S | R | S | R | S |
| BADO | R | S | S | S | S | S | R | S | R | S | R | S |
| BANI | S | S | R | S | R | R | R | S | R | S | R | S |
| BBF | R | S | S | R | S | S | R | S | R | S | R | S |
| BBR | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S | R | S |
| BI | R | S | S | S | S | S | R | S | R | S | R | S |

Sulfametoxazol (SXT), ampicilina (AM), cefalotina (CF), cefotaxima (CTX), levofloxacin (LEV), cefepime (FEP), dicloxacilina (DC), eritromicina (E), gentamicina (GE), cefuroxina (CXM), penicilina (PE), tetraciclina (TE).

L. acidophilus (LA), *L. casei* (LC), *L. paracasei* (LP), *L. rhamnosus* (LR), *B. adolescentis* (BADO), *B. animalis* (BANI), *B. bifidum* (BBF), *B. breve* (BBR), *B. infantis* (BI).

Las letras representan sensibilidad (S) o resistencia (R), basado en los valores promedios ± desviaciones estándar de los halos de inhibición en mm de dos experimentos independientes.

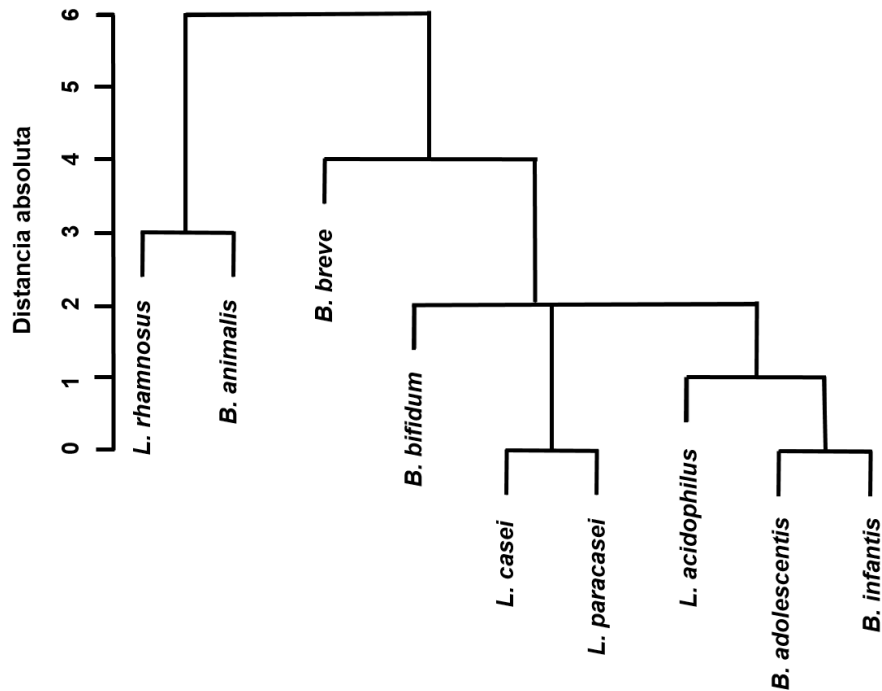


Figura 4. Análisis de conglomerados basado en el algoritmo de distancia promedio, generado a partir de los perfiles de sensibilidad a antibióticos de las cepas control.

5.3 Selección

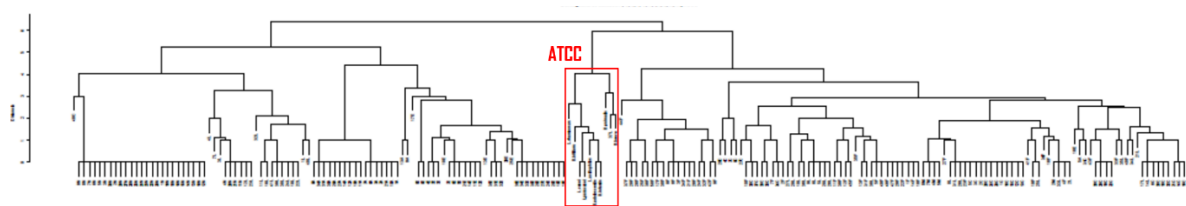
5.3.1 Estandarización de condiciones de fermentación

En la estandarización de las condiciones de fermentación las cepas *B. animalis*, *B. bifidum* y *B. infantis* mostraron elevada producción para Leu, Ile and Val a las 48h de fermentación ($P < 0.05$). Sin embargo, *B. animalis* se estableció como control positivo debido a su producción constante de estos aminoácidos a diferentes tiempos 48, 72 y 96 h (Fig. 6). Adicionalmente esta cepa sobresalió en la producción de los aminoácidos Met, Phe, Trp, His, Tyr y Ser ($P < 0.05$)

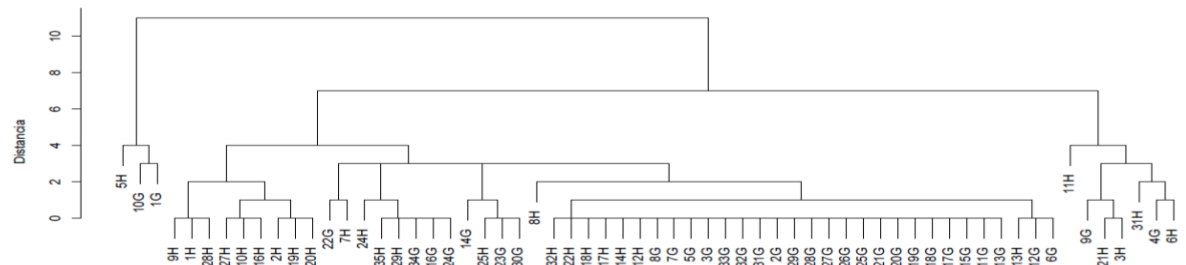
La producción de otros aminoácidos fue variable entre las cepas, con la máxima producción de Ala y Gly por *L. casei*, mientras que para Thr, Arg y Asn fue para *B. infantis*; Lys para *L. rhamnosus*; Asp *B. breve*; Pro para *L. acidophilus* ($P < 0.05$) (Fig. 6). *L.*

rhamnosus fue seleccionado como control negativo debido a la nula producción de aminoácidos ramificados en los diferentes tiempos de fermentación.

a)



b)



c)

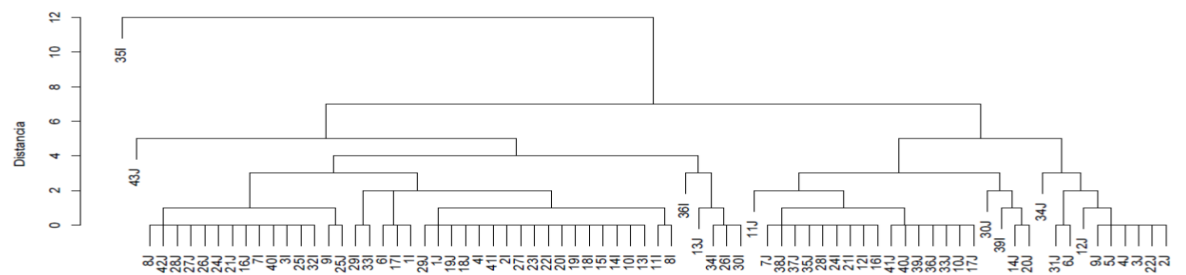


Figura 5. Agrupación de aislados basado en los perfiles de sensibilidad a antibióticos. El análisis de conglomerados se realizó utilizando el algoritmo de distancia promedio para cada región de muestreo. a) Irapuato, b) Pueblo Nuevo, c) Dolores Hidalgo.

5.3.2 Selección de aislados productores de aminoácidos ramificados

Se evaluó un total de 102 aislados seleccionados basados en los perfiles generados en la etapa de preselección. De éstos, solo cinco (11J, 34J, 43J, 35F y 35H) presentaron producción neta (resta del medio sin fermentar) significativa de aminoácidos ramificados respecto a las cepas control seleccionadas. El aislado 11J presentó la más alta producción para Ile, Leu y Val (96, 257 y 136 m/L respectivamente).

Adicionalmente el aislado 11J fue el mejor productor para los aminoácidos esenciales Met y Phe (68 y 145 m/L respectivamente), mientras que para Lys (119.53 m/L) y Thr (62.34 mg/L) el aislado 35F presentó una producción sobresaliente. Ninguna de los aislados presentó capacidad de producción de Trp ($P < 0.05$) (Fig. 7a).

En la producción de aminoácidos no esenciales el perfil estuvo representado por Ala, Arg, Asp, Glu, Gly, His, Pro, Ser y Tyr. De éstos, la producción neta por parte de los aislados en Ala, Asp, Glu, His, Ser y Tyr resultó ser mayor a los controles ($P < 0.05$). Además, los aislados presentaron mayor variabilidad metabólica en la producción de aminoácidos no esenciales, donde 11J sobresalió en la producción de Ala (224 mg/L) e His (39 m/L), 34J para Glu (103 mg/L) y Tyr (64 mg/L), 43J para Ser (60mg/L), 35F para Asp (50 mg/L) y 35H para Glu (102 mg/L) ($P < 0.05$) (Fig. 7b).

5.3.3 Producción de aminoácidos en medio mineral

El perfil de producción de aminoácidos en medio mineral estuvo representado por Ala, Asn, Asp, Arg, Ser, Thr y Val, en los tres tiempos de fermentación. Dentro del perfil de producción solo el aminoácido ramificado Val fue generado durante la fermentación de este medio, destacando con la mayor producción los aislados 11J y 34 J (4.8-5.2 mg/L respectivamente) ($P < 0.05$) (Fig. 8a, b y c).

Por otra parte, los aminoácidos de mayor producción durante la fermentación fueron Arg y Thr, de los cuales el aislado 11J sobresalió en producción de Arg (53-77 mg/L), mientras que el aislado 35H sobresalió en la producción de Thr (84-97 mg/L) ($P < 0.05$). En la producción de Ala los aislados 34J y 11J fueron los mayores productores (15-21 mg/L) ($P < 0.05$). Finalmente, el aislado 35H fue el mayor productor de Ser (5.2-9.2 mg/L), así mismo,

fue el único con capacidad de producción de Asp (2.9-7.1 mg/L) y Asn (4.9-6.6 mg/L) ($P < 0.05$) (Fig. 8a, b, c). Por otra parte, las cepas control no fueron capaces de crecer este medio.

5.3.4 Producción de aminoácidos en consorcios probióticos

La producción de aminoácidos libres totales fue dependiente de la composición del consorcio bacteriano y del tiempo de fermentación. La producción se incrementó en aquellos consorcios donde estuvo presente *L. acidophilus*, con una mayor eficiencia a las 72 h de fermentación ($P < 0.05$). Por otra parte, el consorcio formado por las cepas *Lactobacillus* (Consortio C) sobresalió con un incremento de 5.2 veces la producción, el cual fue superado al incluir el aislado 35H (Consortio M) mejorando a 5.6 veces el contenido de aminoácidos ($P < 0.05$) (Fig. 9).

Los perfiles de aminoácidos generados por los consorcios microbianos, al igual que en la producción de aminoácidos totales fueron afectados por la composición y el tiempo de fermentación. Para la producción de aminoácidos ramificados el consorcio C destacó en la producción de Val (30.4 mg/L), mientras que el consorcio M destacó en la producción de Leu (60.1 mg/L) ($P < 0.05$). La producción del aminoácido Ile fue similar en ambos consorcios (26.4 y 24.1 mg/L para Consortio C y M respectivamente) ($P < 0.05$) (Fig.10).

En la producción de otros aminoácidos esenciales el consorcio C destacó en la producción de Thr (20.3 mg/L) y Trp (4.4 mg/L), mientras que el cultivo M sobresalió en la producción de Met (16.3 mg/L) ($P < 0.05$). El aminoácido Lys disminuyó a nivel de consorcios, pero tuvo la mayor producción para el monocultivo de *L. acidophilus* (32.1 mg/L) ($P < 0.05$). Ningunos de los cultivos presentó capacidad de producción de fenilalanina (Fig. 10).

En la producción de aminoácidos no esenciales, el consorcio C destacó en la mayor producción de los aminoácidos Asp (17.9 mg/L) y Gly (5.8 mg/L), mientras que el consorcio M fue para Glu (97.5 mg/L), Ser (15.1 mg/L) y Tyr (28.3 mg/L). Para estos cultivos la producción de Arg (16.3 y 17.2 mg/L respectivamente) y Pro (77.7 y 72.8 mg/L respectivamente) fue similar. Sin embargo, para los aminoácidos faltantes los consorcios D e I destacaron en su producción, donde el primero fue el mayor productor de Asp (17.9 mg/L) e His (12.8 mg/L) y el segundo de Ala (38.8 mg/L) ($P < 0.05$) (Fig. 10).

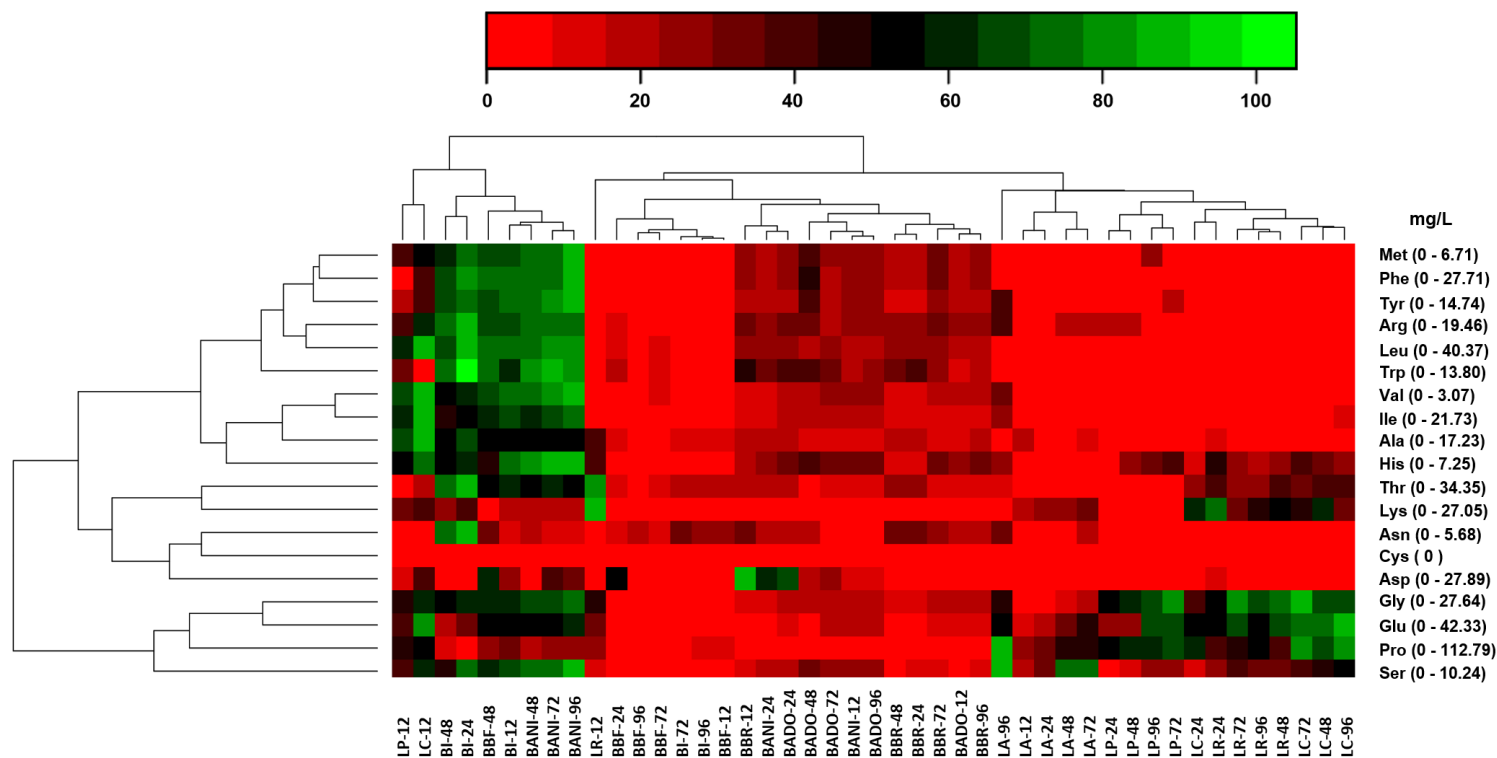


Figura 6. Diagrama de calor de perfiles de aminoácidos libres producidos por fermentación de medio MRS modificado, incubado bajo condiciones anaerobias, 37° C por 12, 24, 48, 72 y 96h. Las cepas son: *L. acidophilus* ATCC 4356 (LA), *L. casei* ATCC 393 (LC), *L. paracasei* ATCC 25302 (LP), *L. rhamnosus* ATCC 53103 (LR), *B. adolescentis* ATCC 15703 (BADO), *B. animalis* ATCC 27530 (BANI), *B. bifidum* ATCC 29521 (BBF), *B. breve* ATCC 15700 (BBR), *B. infantis* ATCC 15707 (BI). Los valores graficados indican la producción neta (resta de medio sin fermentar) y representan los promedios de tres experimentos independientes, normalizados a una escala de 0-100. El límite superior corresponde al máximo valor obtenido para cada aminoácido y es expresado en mg/L. El aminoácido Gln no fue determinado.

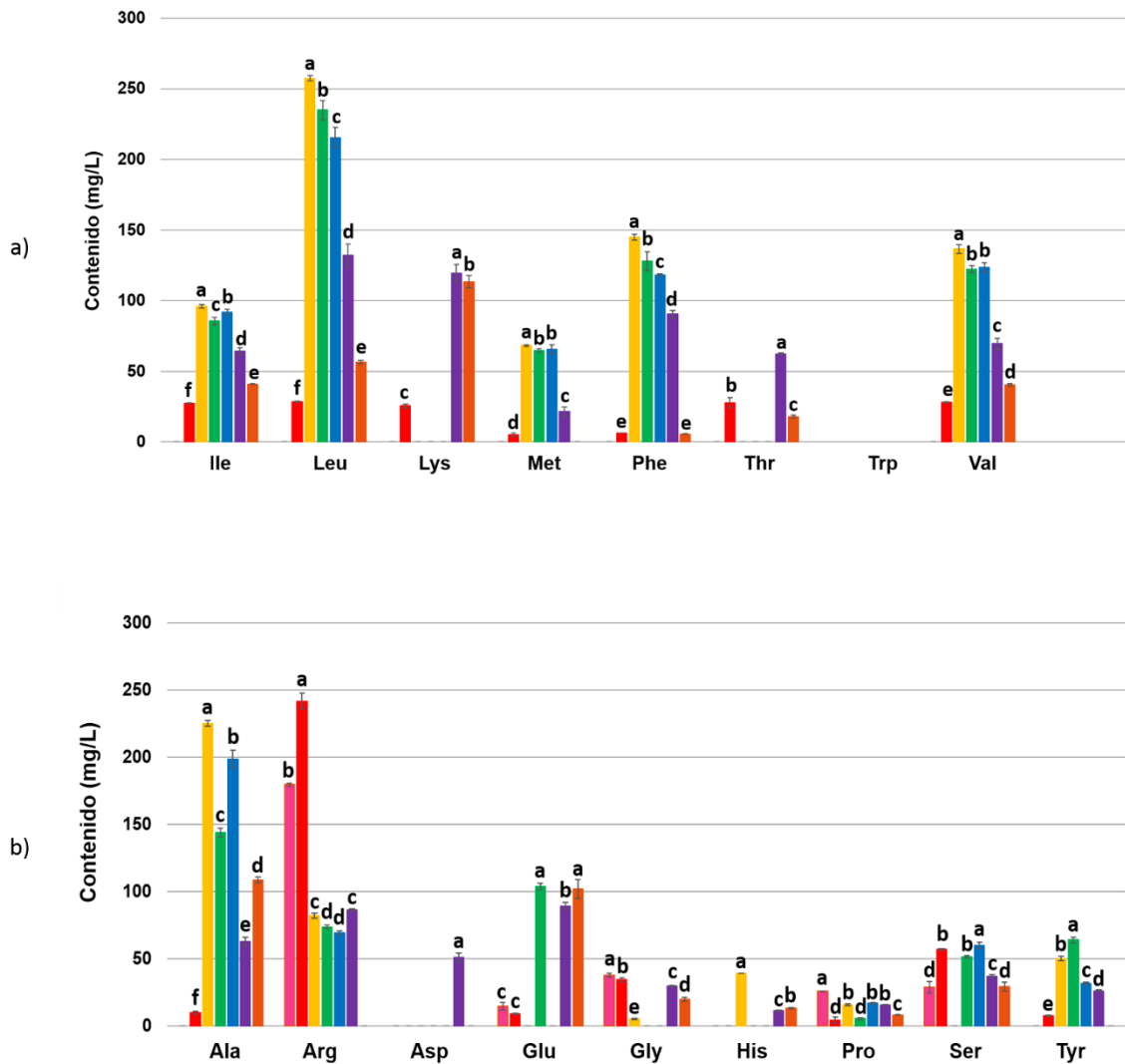


Figura 7. Contenido de aminoácidos libres en medio MRS modificado, fermentado bajo condiciones de anaerobiosis, 37° C por 48 h. a) aminoácidos esenciales, b) aminoácidos no esenciales. (■) *L. rhamnosus* ATCC 53103, (■) *B. animalis* ATCC 27530, (■) aislado 11J, (■) aislado 34J, (■) aislado 43J, (■) aislado 35F y (■) aislado 35H. La información representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y expresa la producción neta de aminoácidos libres (resta de medio sin fermentar). Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre medias, basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

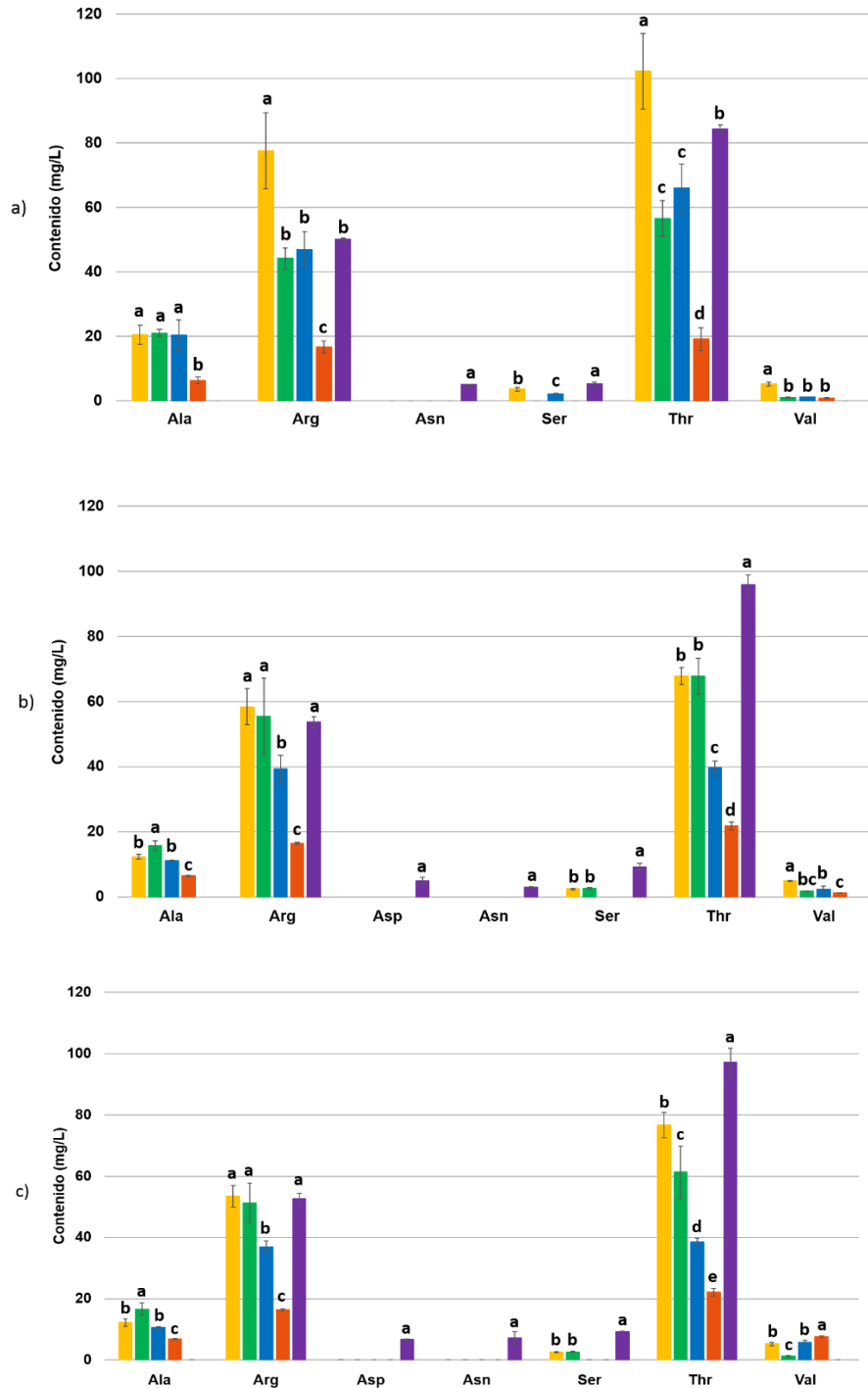


Figura 8. Producción de aminoácidos en fermentación de medio mineral bajo condiciones anaeróbicas a 37° C. a) 24 h, b) 48 h, c) 72 h de fermentación. (■) 11J, (■) 34J, (■) 43J, (■) 35F y (■) 35H. La información representa el promedio ± desviación estándar de tres experimentos independientes y expresa la producción neta de aminoácidos libres. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre medias, basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

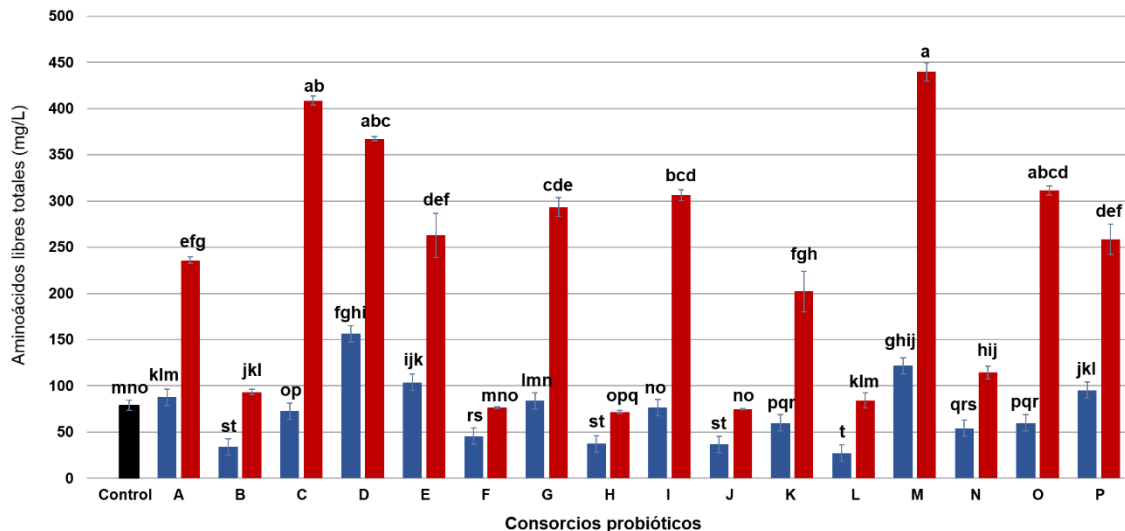


Figura 9. Contenido de aminoácidos libres totales en leche descremada fermentada bajo condiciones de anaerobiosis, 37° C por 24 (■) y 72h (■), (■) control. Las letras en el eje x representan los consorcios probióticos reportados en la Tabla 1. La información representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y las barras con diferentes letras representan diferencias significativas entre medias basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

5.4 Identificación de aislados

La caracterización de los aislados seleccionados se realizó empleando procedimientos moleculares y bioquímicos. El primero consistió en dos procedimientos, que incluyó el análisis de ácidos nucleicos y perfil de lípidos de composición celular, mientras que el segundo se realizó mediante la capacidad metabólica del aislado frente a diferentes sustratos. Basado en esto, los aislados identificados correspondieron a las siguientes especies bacterianas: *Escherichia coli* (11J, 34J y 43J), *Klebsiella pneumoniae* (35F) y *Klebsiella variicola* (35H). En los apéndices C y D se presenta la información a detalle de dicha caracterización. En la Tabla 5 se presenta la información resumida generada en la identificación de los aislados seleccionados.

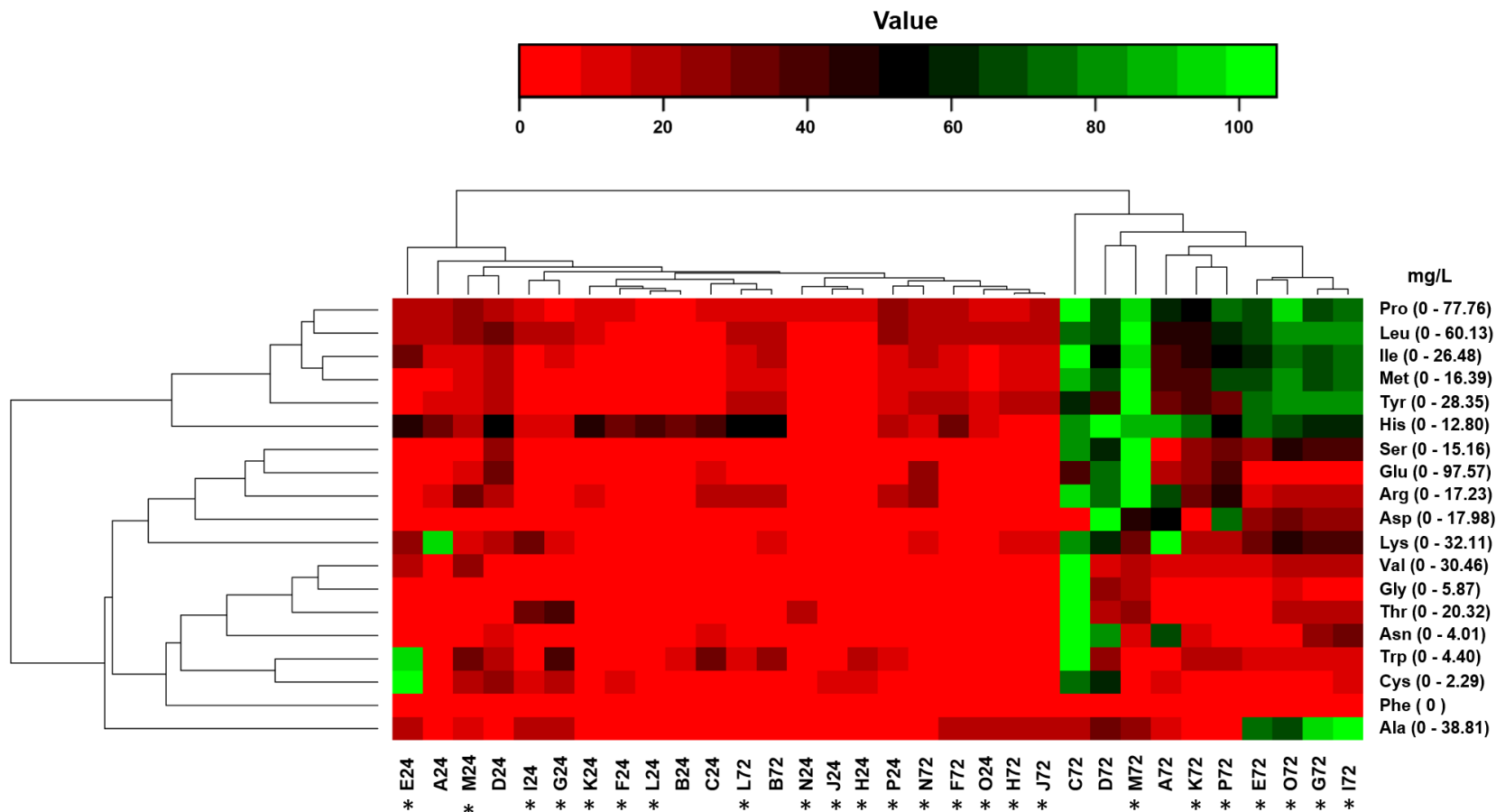


Figura 10. Diagrama de calor de perfiles de aminoácidos obtenidos en fermentación de leche descremada UHT, incubada bajo condiciones anaerobias a 37° C por 24 y 72h. Las letras y los números del eje x designan los consorcios bacterianos referenciados en la sección 3.13 y su respectivo tiempo de fermentación. Los valores graficados indican la producción neta (resta del control) y representan los promedios de tres experimentos independientes, normalizados a una escala de 0-100. El límite superior corresponde al máximo valor obtenido para cada aminoácido y es expresado en mg/L. El aminoácido Gln no fue determinado.

En la identificación mediante la amplificación completa del gen 16S rARN las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos NCBI y fueron depositadas en GenBank con un número de acceso: KY229764 - KY229768 para 11J, 34J, 43J, 35F y 35H respectivamente. Las cepas identificadas presentaron los siguientes valores: Query cover: >98%, E value: 0.0, Ident: >97%. La identificación se realizó por duplicado y las secuencias obtenidas se muestran en el Apéndice C.

Por otra parte, la identificación mediante perfiles lipídicos celulares, se obtuvo por tres comparaciones con bases de datos comercialmente disponibles (TSBA6.10 library). El resultado final de la identificación fue proporcionado por The Food and Environment Research Agency; San Hutton, York, YO41 1LZ U.K (<https://fera.co.uk>), sin embargo, no fueron proporcionados los detalles del protocolo empleado, ni de los patrones generados en la identificación y bases de datos. El indicador proporcionado en la identificación fue: índice de similitud, con una escala de 0 -1.0. Los valores proporcionados fueron: 0.751, 0.831, 0.861, 0.904 y 0.807 para los aislados 11J, 34J, 43J, 35F y 35H respectivamente.

Finalmente, la identificación bioquímica mediante Biolog System se realizó mediante la comparación de los perfiles bioquímicos obtenidos por los aislados y su comparación con la base de datos Biolog420 Databases GN601. La identificación se realizó por duplicado, tomando como referencia valores de probabilidad (PROB) y similitud (SIM). El primero en un rango de 0-100%, mientras que el segundo 0 -1.0. Los valores de identificación fueron los siguientes: PROB 100, 100, 100, 100, 90 y SIM 0.875, 0.885, 0.885, 0.736, 0.575 para los aislados 11J, 34J, 43J, 35F y 35H respectivamente. Los perfiles bioquímicos obtenidos por Biolog system se detallan en el Apéndice B.

Basado en los resultados obtenidos para la identificación de los aislados, se consideró el método molecular 16S rARN y el bioquímico por sistema Biolog como confirmatorio debido a la concordancia de los resultados.

5.5 Propiedades probióticas

5.5.1 Tolerancia a pH y bilis

En la prueba de tolerancia a pH 2.0, las cepas control *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. bifidum*, *B. breve* y *B. animalis* mantuvieron viabilidad a las condiciones evaluadas (Fig. 11a-

b). De éstas, *L. acidophilus* y *B. animalis* mantuvieron la mayor viabilidad, sin embargo, solo la segunda fue capaz de mantener los conteos a 180 min ($P < 0.05$). Por otra parte, el aislado 35F fue el único capaz de resistir las condiciones, presentando conteos a los 90 y 180 minutos con aproximadamente una unidad log menor con respecto a *B. animalis* ($P < 0.05$) (Fig. 11c).

Al igual que para la prueba de tolerancia a pH, las cepas *L. acidophilus* y *B. animalis* fueron las cepas control que mostraron mayor viabilidad en la prueba de tolerancia a bilis. Mientras que *L. acidophilus* presentó reducción de 2 a 3 unidades Log a las concentraciones y tiempos evaluados, *B. animalis* mantuvo conteos constantes ($P < 0.05$) (Fig. 12a, b, d y e). Por otra parte, a excepción del aislado 35H los demás aislados presentaron tolerancia similar a las cepas control *L. acidophilus* y *B. animalis* ($P < 0.05$) (Fig. 12c, f).

Tabla 5 Identificación molecular y bioquímica de los aislados productores de aminoácidos ramificados.

| Aislado | Gen 16S rARN | Perfil lipídico | Biolog |
|----------------|------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 11J | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia fergusonii</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| 34J | <i>Escherichia coli</i> | <i>Shigella sonnei</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| 43J | <i>Escherichia coli</i> | <i>Escherichia fergusonii</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| 35F | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Klebsiella oxytoca</i> |
| 35H | <i>Klebsiella variicola</i> | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Klebsiella variicola</i> |

5.5.2 Crecimiento pH ácido, bilis y lisozima

Se evaluó la capacidad de crecimiento de las cepas en condiciones ácidas, donde la tendencia fue incrementar su densidad poblacional al incrementar el pH (Fig. 13a). Todas las cepas presentaron la mayor viabilidad celular a pH 6.5 ($P < 0.05$), sin embargo, la cepa control *L. casei* y el aislado 35F mostraron un crecimiento similar a pH 5.0 y 6.5 ($P < 0.05$). Además, estas cepas fueron las únicas capaces de crecer a pH 4.0.

La capacidad de crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de bilis presentó una tendencia de inhibición a concentraciones menores (Fig. 13b), donde las cepas *L. casei*, *B. bifidum*, *B. infantis* y *B. adolescentis* presentaron la mayor densidad poblacional a las diferentes concentraciones ($P < 0.05$). A excepción del aislado 35H, las diferentes concentraciones de bilis inhibieron su crecimiento.

Finalmente, la presencia de lisozima en el medio de crecimiento afectó únicamente a las cepas *L. acidophilus* y *B. breve*, inhibiendo su crecimiento a las diferentes concentraciones ($P < 0.05$) (Tabla 6).

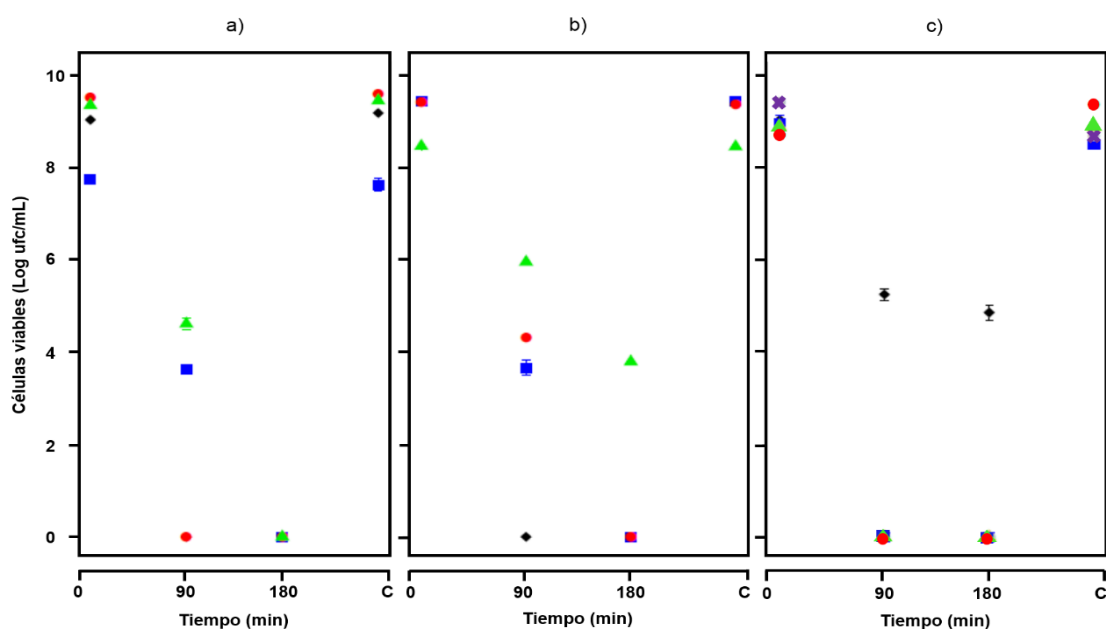


Figura 11. Tolerancia a pH en solución de fosfatos pH 2.0 ajustado con HCl 1N, incubado bajo condiciones aeróbicas a 37° C por 90 y 180 minutos. El control (C) consiste en solución de fosfatos pH 7.0 incubado bajo las mismas condiciones por 180 min. a) (■) *L. acidophilus*, (●) *L. casei*, (▲) *L. paracasei*, (◆) *L. rhamnosus*. b) (■) *B. bifidum*, (●) *B. infantis*, (▲) *B. animalis*, (◆) *B. adolescentis*. c) (■) 11J, (●) 34J, (▲) 43J, (◆) 35F, (✕) 35H. La información representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y expresa el total de células viables. Las letras indican diferencias significativas entre medias, basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

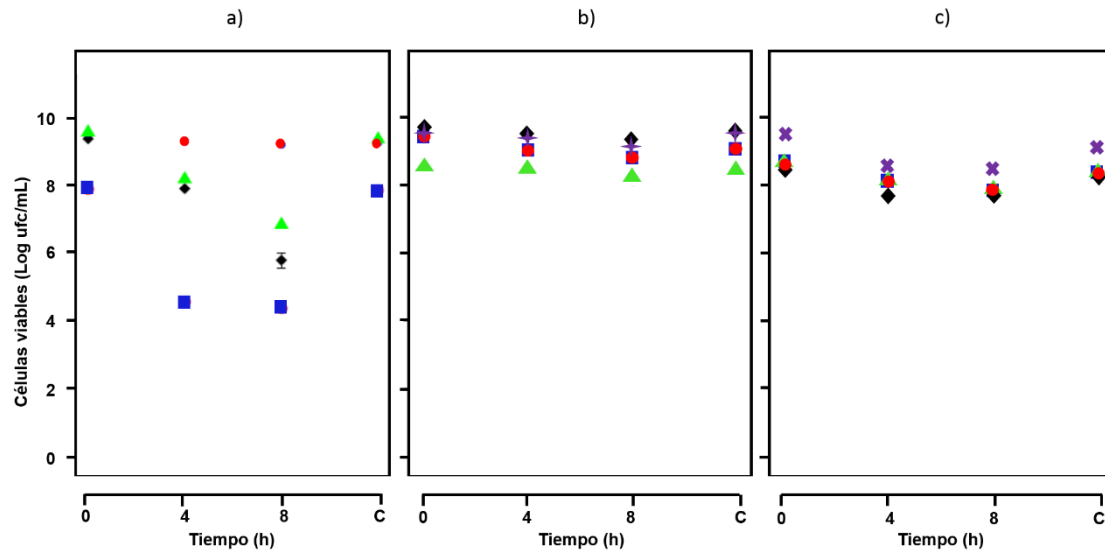


Figura 12. Tolerancia a bilis. a), b) y c) solución de fosfatos al 1% de oxgall. d) e) y f) solución de fosfatos al 3% de oxgall. El pH de ambas soluciones fue ajustado a 5.8 con HCl 1N. Los tratamientos fueron incubados bajo condiciones anaeróbicas a 37 °C por 4 y 8 h. El control (C) consistió de solución de fosfatos pH 7.0 sin oxgall, incubado bajo las mismas condiciones por 8 h. a) y d) (■) *L. acidophilus*, (●) *L. casei*, (▲) *L. paracasei*, (◆) *L. rhamnosus*. b) y e) (■) *B. bifidum*, (●) *B. infantis*, (▲) *B. animalis*, (◆) *B. adolescentis*, (✱) *B. breve*. c) y f) (■) 11J, (●) 34J, (▲) 43J, (◆) 35F, (✱) 35H. La información representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes y expresa el total de células viables.

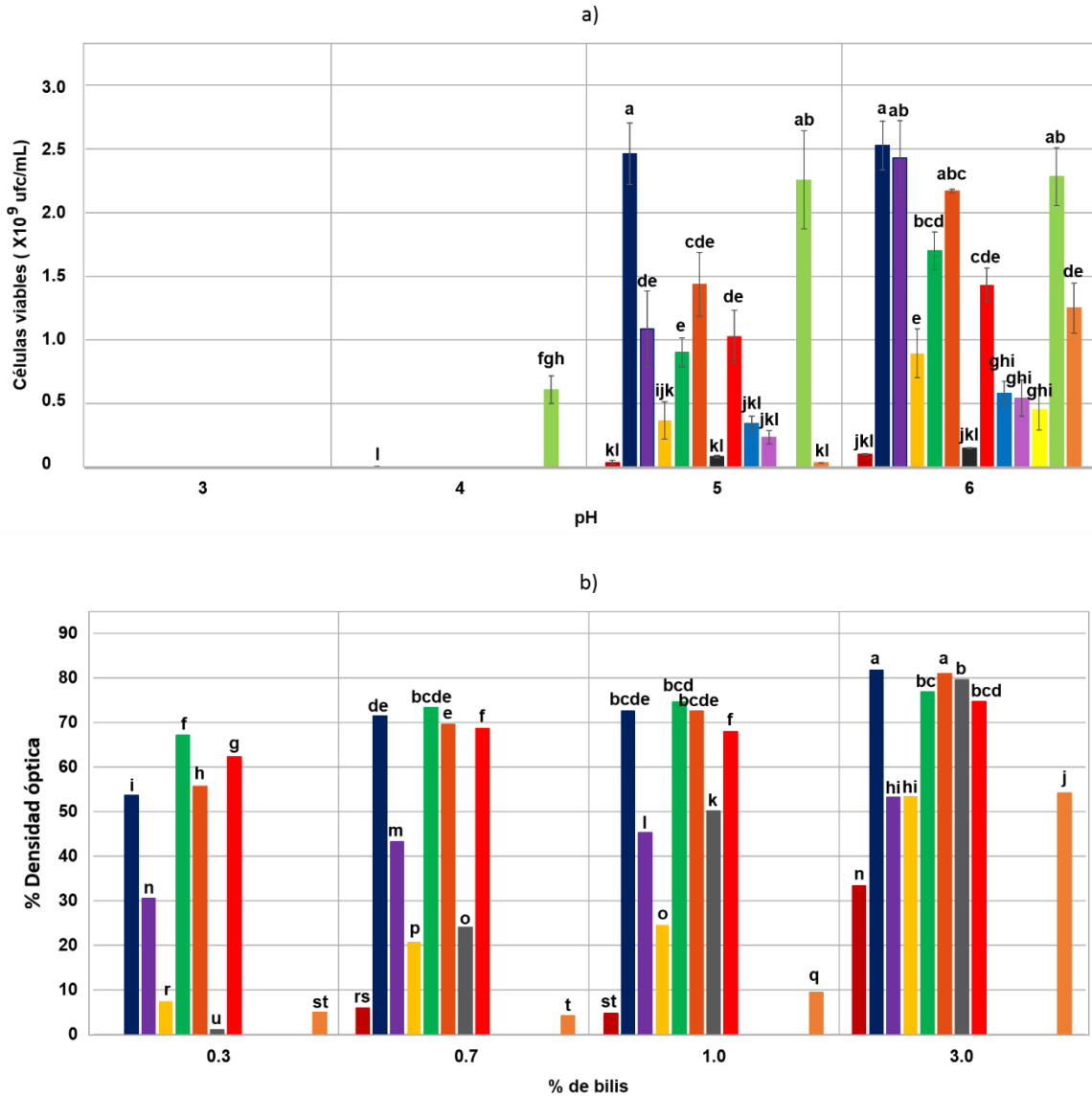


Figura 13. Crecimiento de aislados y cepas control en medio MRS a diferentes pH y concentraciones de bilis, incubado bajo condiciones anaeróbicas a 37°C por 24 horas. a) conteo de células viables a pH 3, 4, 5, 6.5. b) Densidad óptica del cultivo determinada a 600 nm a 0.3, 0.7, 1.0 y 3.0% de oxgall, con ajuste de pH a 6.5 con HCl 1N. Para la prueba de pH, los datos son expresados restando el inóculo inicial para cada cepa. Para la prueba de bilis, los datos de absorbancia fueron normalizados en una escala de 0-100 tomando como referencia el control (medio MRS sin oxgall) de cada cepa. Las cepas son: (■) *L. acidophilus*, (■) *L. casei*, (■) *L. paracasei*, (■) *L. rhamnosus*, (■) *B. bifidum*, (■) *B. infantis*, (■) *B. animalis*, (■) *B. breve*, (■) *B. adolescentis*, (■) 11J, (■) 34J, (■) 43J, (■) 35F, (■) 35H. La información representa el promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes. Las barras con diferentes letras indican diferencias significativas entre medias, basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

6.5.3 Actividad antibacteriana

El efecto antagónico del sobrenadante libre de células neutralizado no presentó efecto inhibitorio contra las bacterias patógenas. En contraste, el sobrenadante no neutralizado mostró un efecto variable dependiente de la cepa y del volumen aplicado. De las cepas control, *B. adolescentis* mostró la máxima inhibición ante *S. flexnerii* y *S. enteritidis*, mientras que para *S. choleraesuis* el mayor efecto antagónico fue similar para *B. adolescentis* y *B. bifidum*, a volúmenes de 250 y 300 μL ($P < 0.05$) (Tabla 7, 8 y 9). Los aislados no presentaron capacidad antagónica contra los patógenos evaluados. En la Tabla 10. Se presenta el pH y la composición de ácidos orgánicos de los sobrenadantes libres de células no neutralizados.

Tabla 6

Tolerancia a lizozima en medio MRS por cepas control y aislados productores de aminoácidos ramificados incubados en anaerobiosis, 37 °C por 24 h.

| Cepas | Concentración de lizozima ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | | | |
|------------------------|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| | 0 | 300 | 500 | 700 |
| <i>L. acidophilus</i> | 1.8 \pm 0.02 ^a | 0.13 \pm 0.01 ^b | 0 ^b | 0 ^b |
| <i>L. casei</i> | 2.0 \pm 0.03 ^a | 2.0 \pm 0.01 ^a | 2.0 \pm 0.03 ^a | 2.0 \pm 0.01 ^a |
| <i>L. paracasei</i> | 2.0 \pm 0.01 ^a | 2.0 \pm 0.02 ^a | 2.0 \pm 0.03 ^a | 2.0 \pm 0.00 ^a |
| <i>L. rhamnosus</i> | 2.0 \pm 0.02 ^a | 2.1 \pm 0.02 ^a | 2.1 \pm 0.02 ^a | 2.1 \pm 0.03 ^a |
| <i>B. adolescentis</i> | 2.0 \pm 0.02 ^a | 2.0 \pm 0.04 ^a | 2.0 \pm 0.04 ^a | 2.0 \pm 0.03 ^a |
| <i>B. bifidum</i> | 2.0 \pm 0.04 ^a | 2.0 \pm 0.00 ^a | 2.0 \pm 0.06 ^a | 2.0 \pm 0.00 |
| <i>B. breve</i> | 1.44 \pm 0.3 ^a | 0.12 \pm 0.08 ^b | 0 ^b | 0 ^b |
| <i>B. infantis</i> | 2.1 \pm 0.07 ^a | 2.1 \pm 0.04 ^a | 2.0 \pm 0.04 ^a | 2.0 \pm 0.02 ^a |
| 11J | 1.3 \pm 0.01 ^a | 1.3 \pm 0.03 ^a | 1.3 \pm 0.01 ^a | 1.3 \pm 0.02 ^a |
| 34J | 1.2 \pm 0.01 ^a | 1.3 \pm 0.05 ^a | 1.3 \pm 0.00 ^a | 1.3 \pm 0.03 ^a |
| 43J | 1.3 \pm 0.03 ^a | 1.3 \pm 0.01 ^a | 1.3 \pm 0.01 ^a | 1.2 \pm 0.00 ^a |
| 35F | 0.79 \pm 0.00 ^a | 0.76 \pm 0.00 ^a | 0.78 \pm 0.00 ^a | 0.78 \pm 0.00 ^a |
| 35H | 1.9 \pm 0.02 ^a | 1.9 \pm 0.04 ^a | 1.9 \pm 0.03 ^a | 1.9 \pm 0.03 ^a |

Los valores representan el valor promedio \pm desviación estándar de la absorbancia medida a 600 nm de tres experimentos independientes.

Los superíndices indican diferencia significativa de los tratamientos respecto al control de cada cepa basado en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

5.5.4 Compatibilidad entre aislados y con cepas probióticas

La prueba de compatibilidad reveló que los aislados no mostraron efecto antagónico entre ellos, mientras que las cepas control mostraron un efecto inhibitorio que abarcó de débil a moderado. Todos los aislados presentaron un comportamiento similar frente a las cepas control, siendo *L. rhamnosus* la cepa control que mayor efecto antagónico ejerció, seguida por *L. casei*, *L. paracasei* y *B. bifidum*. En la Fig. 14 se muestra la prueba de compatibilidad

para uno de los aislados con las cepas control y demás aislados, mientras que en la Tabla 11 se reportan los resultados de compatibilidad de los aislados y las cepas control.

5.6 Potencial uso en alimentos lácteos fermentados

5.6.1 Cambio de pH y células viables

Se determinó la viabilidad celular de las cepas que formaron el consorcio de mayor producción de aminoácidos ramificados (M). Dentro de este consorcio el crecimiento de *L. acidophilus* y cepas del grupo *L. casei* no se vieron afectadas ($P < 0.05$). Estas cepas presentaron un máximo crecimiento a las 24 h con reducción de una y dos unidades logarítmicas respectivamente al término de la fermentación. Sin embargo, el crecimiento de *K. variicola* fue significativamente afectado durante el proceso fermentativo con una reducción de cuatro y cinco unidades logarítmicas a 24 y 72 h de fermentación respectivamente ($P < 0.05$) (Fig. 15a).

Adicionalmente se determinó el cambio de pH durante el proceso de fermentación del Consorcio M, tomando como referencia los cultivos puros de las respectivas cepas que lo formaron. El cultivo puro de *K. variicola* presentó un ligero incremento de pH al término de la fermentación con pH 6.0, mientras que el *L. acidophilus* mantuvo una reducción gradual llegando a un pH 4.1 al término. En cuanto a las cepas del grupo *L. casei*, sólo el cultivo puro de *L. casei* presentó una ligera reducción con un pH 5.4 al final del proceso, en contraste a *L. paracasei* y *L. rhamnosus* con pH 6.2 y pH 6.3 respectivamente. Sin embargo, el Consorcio M presentó una reducción significativa respecto a los monocultivos y al Consorcio C ($P < 0.05$) (Fig. 15b).

5.6.2 Producción de compuestos volátiles

Se determinó el perfil de volátiles producidos durante la fermentación de leche UHT por tres consorcios bacterianos (C, N y M), así como de tres productos comerciales (yogurt Oikos, quesos Emmental y Gouda). Se lograron detectar un total de 59 compuestos volátiles, de los cuales 49.15% fueron hidrocarburos (40.6% alifáticos y 8.4% aromáticos), 16.9% ácidos carboxílicos, 10.1% ésteres, 8.4% alcoholes, 8.4% cetonas, 5.08% aldehídos y 1.69% compuestos azufrados.

Los perfiles generados fueron afectados por la composición del consorcio microbiano. El Consorcio C produjo la mayor diversidad de compuestos volátiles (57.6% del total determinados) a 24 y 48h de fermentación. Sin embargo, la adición de *K. variicola* (Consortio M) modificó el perfil obtenido. El consorcio C incrementó y produjo un 37.9% más de compuestos volátiles respecto al consorcio M, siendo contrastante en la producción de aldehídos, ésteres y ácidos carboxílicos. Sin embargo, la concentración de volátiles del consorcio M resultó ser más elevada que el Consorcio C (AR= 18.3-19.3 y AR=2.6-2.7 respectivamente), representando un incremento de 6.95 y 7.02 veces la concentración a 24 y 48 h de fermentación. Los productos comerciales mostraron mayor variabilidad de compuestos respecto al consorcio M, sin embargo, la concentración de volátiles fue muy baja (AR= 1.55, 1.64 y 1.97 para yogurt Oikos, queso Emmental y Gouda respectivamente) (Fig. 16).

El perfil metabólico generado por el Consorcio M presentó variaciones cualitativas respecto al Consorcio C. El contraste generado por el consorcio M fue la producción de: 2,3 butanediol, 4-metil-2-hexanona y octanol, mientras que el Consorcio C en contraste produjo los ácidos: butanoico, láctico y nonanoico, así como undecanona y decanal. De estos compuestos sólo decanal y nonanoico fueron encontrados en los productos comerciales. El contenido de hidrocarburos fue variable en ambos consorcios y respecto a los productos comerciales, sin embargo, la mayor diferencia estuvo en la nula producción de ésteres por parte del Consorcio M respecto al resto.

Por otra parte el elevado contenido que caracterizó al consorcio M respecto al resto de las muestras estuvo representado por incremento considerable de ciertos compuestos respecto a la mayor producción. El incremento del consorcio M respecto a C fue de 59.09 veces el contenido de etanol, 7.7 veces ácido acético, 4.76 veces ácido octanoico, 3.58 ácido hexanoico y 2.58 veces acetoina, manteniendo valores similares para 2-nonanona. El contenido de volátiles de N en contraste a N fue la producción de metilglioxal, dimetil trisulfuro y variaciones cualitativas y cuantitativas en contenido de hidrocarburos. Finalmente, el incremento en producción de compuestos del Consorcio M respecto a los productos comerciales fue: 18.26-56.14 veces etanol, 11.9-319.51 veces ácido acético, 9.79-27.58 veces ácido hexanoico, 7.52-31.68 ácido octanoico y 3.60-5.29 veces 2-nonanona.

Tabla 7 Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra *Shigella flexnerii* ATCC 12022.

| Volumen (μ L) | Halo de inhibición (diámetro en mm) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | LA | LC | LP | LR | BADO | BANI | BBF | BBR | BI | 11J | 34J | 43J | 35F | 35H |
| 50 | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |
| 100 | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |
| 150 | 0 ^r | 0 ^r | 12.1 \pm 0.1 ^{mn} | 10.1 \pm 0.3 ^q | 13.2 \pm 0.3 ^{ijk} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 11.2 \pm 0.2 ^{op} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |
| 200 | 0 ^r | 12.1 \pm 0.1 ^{mn} | 12.4 \pm 0.4 ^{mn} | 12.1 \pm 0.1 ^{mn} | 15.1 \pm 0.1 ^{cd} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 11.6 \pm 0.2 ^{no} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |
| 250 | | 12.8 \pm 0.6 ^{kl} | 14.6 \pm 0.3 ^{def} | 14.3 \pm 0.3 ^{fgh} | 15.8 \pm 0.3 ^b | 13.2 \pm 0.2 ^{jk} | 13.8 \pm 0.1 ^{gih} | 0 ^r | 13.5 \pm 0.1 ^{hij} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |
| 300 | 10.9 \pm 0.2 ^p | 14.1 \pm 0.2 ^f | 15.5 \pm 0.4 ^{bc} | 14.4 \pm 0.4 ^{ef} | 16.9 \pm 0.1 ^a | 14.7 \pm 0.1 ^{def} | 14.9 \pm 0.1 ^{de} | 13.8 \pm 0.1 ^{gih} | 14.8 \pm 0.1 ^{def} | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r | 0 ^r |

Tabla 8 Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra *S. choleraesuis* ATCC 10708.

| Volumen (μ L) | Halo de inhibición (diámetro en mm) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | LA | LC | LP | LR | BADO | BANI | BBF | BBR | BI | 11J | 34J | 43J | 35F | 35H |
| 50 | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |
| 100 | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |
| 150 | 0 ^o | 0 ^o | 10.9 \pm 0.6 ^{klm} | 0 ^o | 14.7 \pm 0.3 ^g | 0 ^o | 15.4 \pm 0.1 ^{ef} | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |
| 200 | 0 ^o | 0 ^o | 11.4 \pm 0.2 ^{ijkl} | 11.6 \pm 0.3 ^{ij} | 15.7 \pm 0.3 ^{de} | 0 ^o | 16.0 \pm 0.1 ^c | 0 ^o | 11.9 \pm 0.1 ^{ij} | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |
| 250 | 11.6 \pm 0.2 ^m | 10.9 \pm 0.2 ^{lm} | 14.8 \pm 0.3 ^{fg} | 11.5 \pm 0.2 ^{ijk} | 17.6 \pm 0.2 ^b | 0 ^o | 17.2 \pm 0.1 ^b | 0 ^o | 14.4 \pm 0.4 ^g | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |
| 300 | 11.9 \pm 0.1 ⁱ | 11.3 \pm 0.1 ^{ijkl} | 15.9 \pm 0.1 ^c | 13.2 \pm 0.1 ^h | 18.2 \pm 0.1 ^a | 0 ^o | 18.1 \pm 0.1 ^a | 0 ^o | 16.0 \pm 0.3 ^c | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o | 0 ^o |

Tabla 9 Actividad antibacteriana de sobrenadante libre de células no-neutralizado de cepas control y aislados contra *S. enteritidis* ATCC 1045.

| Volumen (μ L) | Halo de inhibición (diámetro en mm) | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | LA | LC | LP | LR | BADO | BANI | BBF | BBR | BI | 11J | 34J | 43J | 35F | 35H |
| 50 | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |
| 100 | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |
| 150 | 0 ^z | 0 ^z | 10.6 \pm 0.2 ^x | 12.1 \pm 0.4 ^s | 13.7 \pm 0.2 ^m | 0 ^z | 13.5 \pm 0.1 ⁿ | 11.8 \pm 0.1 ^t | 11.5 \pm 0.3 ^u | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |
| 200 | 0 ^z | 11.2 \pm 0.1 ^w | 13.0 \pm 0.6 ^o | 14.9 \pm 0.1 ^g | 15.0 \pm 0.2 ^f | 0 ^z | 14.1 \pm 0.1 ^k | 12.3 \pm 0.1 ^r | 12.5 \pm 0.1 ^q | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |
| 250 | 10.4 \pm 0.4 ^y | 13.8 \pm 0.4 ^l | 14.5 \pm 0.4 ⁱ | 15.7 \pm 0.2 ^e | 16.2 \pm 0.1 ^c | 11.4 \pm 0.2 ^v | 15.0 \pm 0.2 ^f | 12.8 \pm 0.0 ^p | 13.7 \pm 0.2 ^j | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |
| 300 | 10.5 \pm 0.3 ^y | 14.9 \pm 0.1 ^g | 14.6 \pm 0.2 ^h | 16.5 \pm 0.1 ^b | 17.1 \pm 0.0 ^a | 12.1 \pm 0.1 ^s | 15.8 \pm 0.1 ^d | 13.8 \pm 0.2 ^m | 14.4 \pm 0.2 ^l | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z | 0 ^z |

La información expresada en las tablas 5, 6 y 7, representa el valor promedio \pm desviación estándar de tres experimentos independientes.

Diferentes superíndices indican diferencia significativa entre medias para cada patógeno, basada en la prueba de Turkey a $P < 0.05$.

Cepas control: (LA) *L. acidophilus*, (LC) *L. casei*, (LP) *L. paracasei*, (LR) *L. rhamnosus*, (BADO) *B. adolescentis*, (BANI) *B. animalis*, (BBR) *B. breve*, (BI) *B. infantis*. Aislados productores de aminoácidos: 11J, 34J, 43J, 35F y 35H.

Tabla 10 Contenido de principales ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de medio MRS bajo condiciones anaeróbicas, 37° C por 24 h.

| Cepa | pH | Láctico (mg/100 µL) | Acético (mg/100 µL) |
|------------------------|-----------|---------------------|---------------------|
| <i>L. acidophilus</i> | 4.27±0.02 | 1.02±0.01 | 0.31±0.00 |
| <i>L. casei</i> | 3.82±0.01 | 1.90±0.01 | 0.28±0.00 |
| <i>L. paracasei</i> | 3.72±0.02 | 2.12±0.01 | 0.25±0.00 |
| <i>L. rhamnosus</i> | 3.71±0.00 | 2.18±0.01 | 0.24±0.00 |
| <i>B. adolescentis</i> | 3.91±0.01 | 1.87±0.03 | 0.37±0.00 |
| <i>B. animalis</i> | 4.63±0.03 | 0.92±0.04 | 0.40±0.00 |
| <i>B. bifidum</i> | 4.06±0.01 | 1.87±0.08 | 0.33±0.01 |
| <i>B. breve</i> | 4.09±0.11 | 1.90±0.03 | 0.34±0.00 |
| <i>B. infantis</i> | 4.18±0.09 | 1.57±0.01 | 0.32±0.00 |
| 11J | 5.30±0.04 | 0.11±0.01 | 0.46±0.00 |
| 34J | 5.34±0.02 | 0.11±0.00 | 0.47±0.00 |
| 43J | 5.38±0.01 | 0.11±0.00 | 0.49±0.00 |
| 35F | 5.25±0.00 | 0.20±0.01 | 0.34±0.02 |
| 35H | 6.60±0.02 | 0.12±0.01 | 0.10±0.01 |
| Control | 6.65±0.04 | 0.0 | 0.37±0.00 |

Tabla 11 Compatibilidad entre aislados seleccionados y cepas control.

| Isolates | Probiotic strains | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------------|----|-----|----|------|------|-----|-----|----|
| | LA | LC | LPC | LR | BANI | BADO | BBF | BBR | BI |
| <i>E. coli</i> 11J | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + |
| <i>E. coli</i> 34J | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + |
| <i>E. coli</i> 43J | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | + | ++ |
| <i>K. pneumoniae</i> 35F | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + |
| <i>K. variicola</i> 35H | + | ++ | ++ | ++ | + | + | ++ | + | + |

Inhibition zones: > to 25 mm were declared as very strong (++++), from 15 to 25 mm as strong (+++), from 7 to 15 as moderate (++) and <7 as weak activities (+), no activity (-). The strains are: *L. acidophilus* ATCC 4356 (LA); *L. casei* ATCC 393 (LC); *L. paracasei* ATCC 25302 (LPC); *L. rhamnosus* ATCC 53103 (LR); *B. animalis* ATCC 27530 (BANI); *B. adolescentis* ATCC 15703 (BADO); *B. bifidum* ATCC 29521 (BBF); *B. breve* ATCC 15700 (BBR); *B. infantis* ATCC 15707 (BI) and selected isolates (11J, 34J, 43J, 35F and 35H).

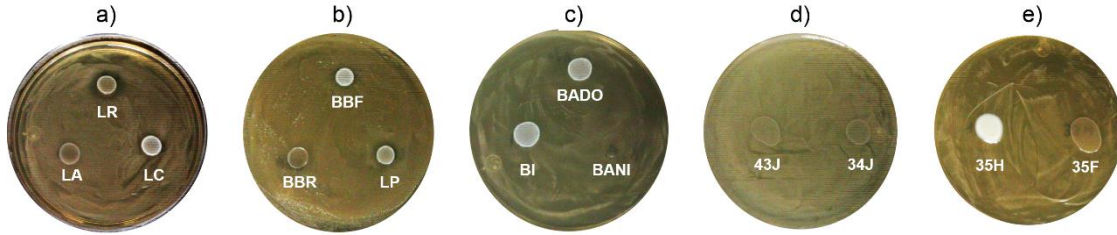
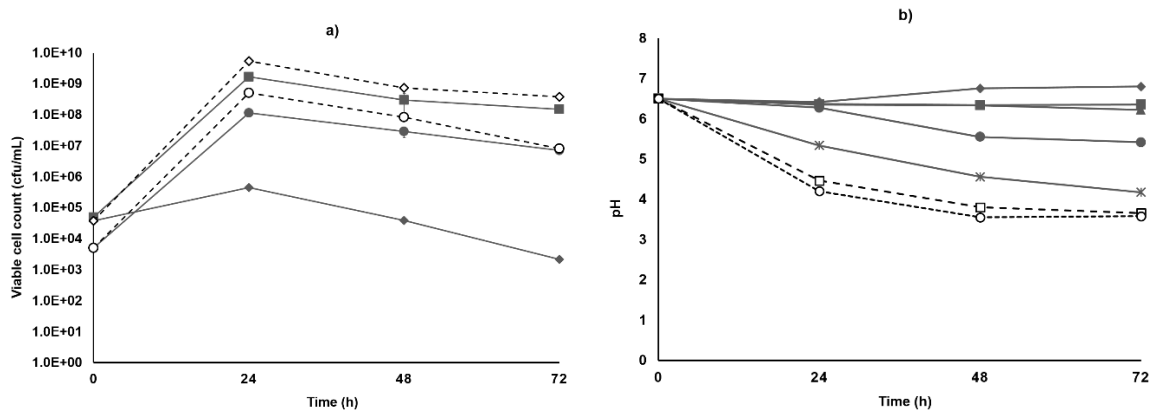


Figura 14. Prueba de compatibilidad entre aislados y con cepas control. a), b), c) compatibilidad entre aislado 11J y cepas control. d) y e) compatibilidad del aislado 11J con los demás aislados productores de aminoácidos ramificados. Las cepas son: (LA) *L. acidophilus*, (LC) *L. casei*, (LP) *L. paracasei*, (LR) *L. rhamnosus*, (BADO) *B. adolescentis*, (BANI) *B. animalis*, (BBR) *B. breve*, (BI) *B. infantis*, (11J, 34J, 43J, 35F y 35H) aislados seleccionados productores de aminoácidos ramificados.



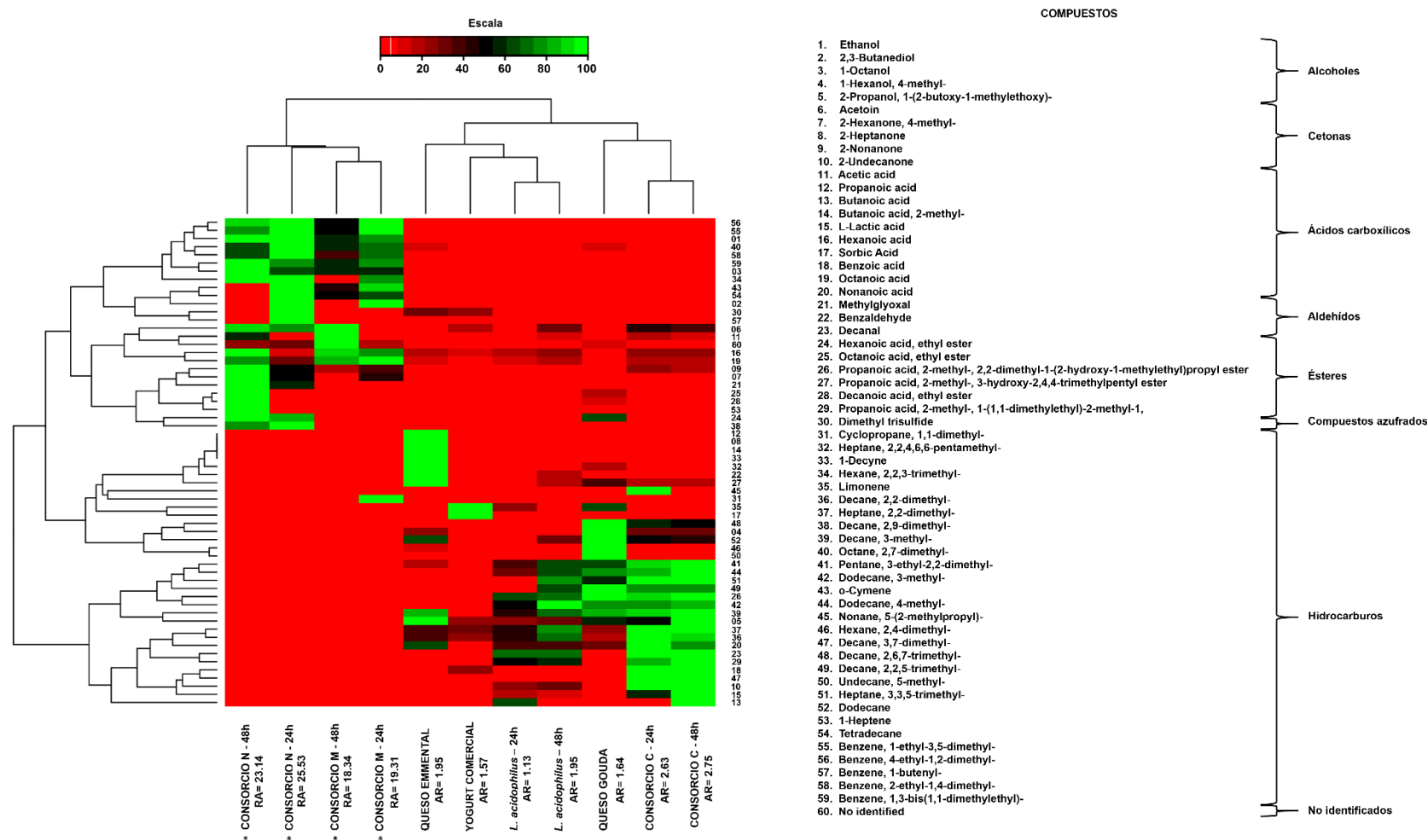


Figura 16. Mapa de calor de perfiles de compuestos volátiles generados por fermentación de leche descremada UHT bajo condiciones de anaerobiosis a 37 °C por 24 y 48 h. Las cepas evaluadas son: *L. acidophilus* ATCC 4356, Consortium C (*L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC 25302 and *L. rhamnosus* ATCC 53103), Consorcio M (*K. variicola* 35H, *L. acidophilus* ATCC 4356, *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC 25302 y *L. rhamnosus* ATCC 53103), Consorcio N (*K. variicola* 35H, *L. casei* ATCC 393, *L. paracasei* ATCC 25302 y *L. rhamnosus* ATCC 53103) y productos lácteos fermentados comerciales (Yogurt, Emmental and Gouda cheese). Los valores representan los promedios de tres experimentos independientes y fueron normalizados a una escala de 0-100. El límite superior corresponde al máximo valor de Area Relativa (AR) determinada para cada compuesto.

6. DISCUSIÓN

6.1 Identificación de cepas

La selección de los aislados productores de aminoácidos ramificados estuvo representada por cinco cepas, todas ellas pertenecientes al Filo Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales, Familia Enterobacteriaceae, y con distribución en tres géneros: *Escherichia* y *Klebsiella*. Estos resultados corresponden con Jost et al. (2012), donde reportan la implantación de Enterobacterias al nacer, las cuales forman parte de la flora responsables de la reducción del contenido de oxígeno presente en TGI. Además, se reportan este tipo de bacterias como parte de la flora normal del ser humano, con densidades menores que *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en infantes lactantes (Mueller et al. 2015; Rajilic-Stojanovic et al. 2007).

6.2 Producción de aminoácidos

En la producción de aminoácidos los medios utilizados (medio mineral, MRS modificado y leche descremada) influyeron de manera significativa en el metabolismo de las bacterias evaluadas. En medio mínimo, las cepas control fueron incapaces de crecer, lo cual corresponde con Altermann et al. (2005) y Cai et al. (2009), donde reportan la presencia de auxotrofías para las cepas de *L. acidophilus*. La primera con auxotrofías para 14 de los aminoácidos, mientras que las segundas para aminoácidos de cadena ramificada. Para cepas del género *Bifidobacterium*, la presencia de auxotrofías es cepa dependiente y algunas presentan auxotrofías para síntesis de vitaminas, incapacitando su crecimiento en medio mineral (Lee and O' Sullivan, 2010).

Por otra parte, el crecimiento de los aislados en medio mínimo corresponde a lo reportado por Reitzer (2003) y Magazanik (1978) donde bacterias entéricas a partir de nitrógeno inorgánico sintetizan *de novo* los 20 aminoácidos. Este proceso inicia con la toma de amonio a partir del sustrato, posteriormente es incorporado en aminoácidos glutamato y glutamina, los cuales subsecuentemente actúan como donadores en reacciones de transaminación y transamidación. Esto conduce a síntesis de otros aminoácidos y a precursores para biosíntesis de ácidos nucleicos (Magasanik 1996; Merrik & Eduards 1995; Zalkin & Smith 1998). En este estudio, el perfil de aminoácidos generado en la fermentación de medio mineral por parte de los

aislados, estuvo representada por cuatro familias: Asp, Asn y Thr, que pertenecen a la familia del Asp; Ala y Val a la familia del piruvato; Arg a la familia del glutamato y Ser a la familia Serina-Glicina (Moat et al. 2002). Reitzer (2003) reporta que *E. coli*, a partir de asimilación de amonio, incrementa la síntesis de Glu, Arg, Lys, Asp y Ser.

La síntesis de Thr sirve como precursor para la síntesis de aminoácidos ramificados (Moat et al. 2002), y previamente se ha reportado su síntesis por microbiota de intestino delgado de humanos (Metges et al.1999). La producción de aminoácidos ramificados Ile y Leu fue nula, mientras que para Val fue mínima en cuatro de los aislados. La producción de este último aminoácido se ha reportado en algunas cepas de *E. coli* y *Salmonella*, donde su producción en biofilms puede desempeñar varios roles: protector osmolar (Shahjee et al. 2002), molécula señal (Roesch et al. 2003) y se ha hipotetizado su producción como un inhibidor de crecimiento pues ejerce presión selectiva sobre fenotipos resistentes a este aminoácido en ambientes no limitados en fuente de energía (Valle et al. 2008). Además, Webb (1958, 1968) reporta que la adición del inhibidor de crecimiento aminopterina en cultivo de *Aerobacter aerogenes*, bajo condiciones reducidas en oxígeno y suficiente energía, conduce a una disminución del ciclo de Krebs y acumulación de piruvato, lo cual da como resultado producción de Ala y Val. Estos datos pueden explicar la producción de estos aminoácidos en medio mineral.

Por otra parte, la producción de aminoácidos en medio MRS modificado por las cepas control fue variable, sobresaliendo las cepas de *Bifidobacterium* respecto a las de *Lactobacillus*. Estos resultados podrían explicarse por el hecho de que a pesar que se han determinado más peptidasas en *Lactobacillus* (93-147) respecto a *Bifidobacterium* (54-127) en las especies evaluadas, las primeras presentan mayor número de auxotrofias y esto implica mayor utilización de los aminoácidos liberados para su crecimiento, reflejando una reducción del contenido de aminoácidos libres en el medio de cultivo (Rawlings 2014). Además, los cultivos fermentados de las cepas tanto productoras como no productoras siempre mantuvieron una cantidad de aminoácidos libres en el medio. Esto se explica debido a que el gen CodY inhibe la expresión peptidasas intracelulares, transportadores y permeasas de aminoácidos ramificados en presencia de medio rico (péptidos), sin embargo, el mecanismo de regulación del gen CodY ha sido bien caracterizado en *Lactococcus lactis* y *Bacillus subtilis*, siendo muy poco estudiado en otras BAL. Se ha reportado que los componentes del sistema proteolítico son cepa dependiente y que

diversos genes (algunas peptidasas) se regulan de manera independiente del gen CodY, siendo regulados por factores, tales como: contenido de oxígeno y carbohidratos fermentables (Chambellon e Yvon, 2003; Guédon et al. 2001a,b; Heber et al. 2000; Hengs et al. 2005; Marugg et al. 1995; Meijer et al. 1996; Mozzi et al. 2010; Sanz et al. 2001; Savijoki et al. 2006). Además, esta variabilidad en la presencia de peptidasas y su mecanismo de regulación podría estar relacionado con el comportamiento de las cepas en los perfiles de fermentación, donde las cepas del grupo *L. casei* presentaron perfiles de aminoácidos más similares.

Por otra parte, los aislados seleccionados superan metabólicamente a las cepas control pues son capaces de crecer en medio mineral con amonio como única fuente de nitrógeno, indicando ausencia de auxotrofias para la síntesis de los 20 aminoácidos (Liao et al. 2011; Tatusov et al. 1996). También, se ha reportado que bajo condiciones aeróbicas fuente preferible para *Escherichia coli* es amonio, utilizando fuentes alternativas bajo condiciones anaerobias (Reitzer, 2003). Sin embargo, bajo estas condiciones se induce la expresión de diversas peptidasas (Miller, 1975). Además, bajo condiciones ricas en nitrógeno (péptidos) se modifica el perfil de expresión de genes regulados por Lrp. Dentro de esto, incrementa la expresión de transportadores de oligopéptidos, disminuye la expresión de permeasas de aminoácidos ramificados, lo cual puede explicar el incremento de estos aminoácidos en el medio de cultivo fermentado. Las diferencias en los perfiles de aminoácidos generados bajo estas condiciones podrían explicarse en términos de variabilidad genética de las cepas y sus mecanismos regulatorios.

Finalmente, en la producción de aminoácidos en leche descremada, *L. acidophilus* fue la única cepa control capaz de adaptarse al sustrato y liberar aminoácidos al medio, lo cual indica la presencia de un sistema proteolítico más eficiente, pues dispone de proteinasas extracelulares capaces de degradar la proteína láctea, en contraste a las demás cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La expresión de estas proteinasas es inducida por la presencia de fuentes de nitrógeno complejas y concentraciones reducidas de aminoácidos ramificados (Altermann et al. 2005; Liu et al. 2010; Siragusa et al. 2014). Además, el incremento en el contenido total de aminoácidos libres en los consorcios microbianos se puede explicar debido a la complementación metabólica de las cepas que intervienen, donde la participación de los diversos componentes del sistema proteolítico específico de cepa, así como sus necesidades

nutricionales y su capacidades metabólicas adicionales generaron variaciones en términos de producción (Crow et al. 2001; De Angelis & Gobetti, 2011).

El perfil de aminoácidos generado por *L. acidophilus* consistió de 17 aminoácidos, con un incremento a 18 cuando se integró con las cepas del grupo *L. casei* y *B. animalis*. La producción para los diferentes aminoácidos se incrementó de 30-90% en los consorcios respecto al cultivo puro de *L. acidophilus*. Estos resultados reflejan la complementación metabólica de las cepas en cultivo mixto, como se ha reportado para algunos cultivos iniciadores en alimentos lácteos fermentados (Bergamini et al. 2009; Settachaimongkon et al. 2014; Shihata & Shah, 2000; Yilmaz & Kurdal, 2014). El contenido de aminoácidos incrementó significativamente al tiempo final de fermentación (72h), sugiriendo que la acumulación de péptidos como resultado de la hidrólisis de proteína láctea podría resultar en la inhibición de transportadores de péptidos, peptidasas y permeasas de aminoácidos de cadena ramificada bajo regulación por CodY. Además, bajo condiciones ambientales desfavorables como bajo pH, reducción de nutrientes e incremento de sustancias tóxicas, los cultivos drásticamente reducen su crecimiento, minimizando la utilización de aminoácidos libres y liberando peptidasas debido a la lisis celular. Este proceso es muy común en productos lácteos tales como: soft cheese (Burns et al. 2012; Iličić et al. 2012), Cheddar (Crow et al. 2001; Ong et al. 2006), semi hard cheese (Bergamini et al. 2009) and Pategrás cheese (Bergamini et al. 2010).

De los consorcios evaluados, el Consorcio M (formado por *L. acidophilus* + cepas del grupo *L. casei* + aislado *Klebsiella variicola*) presentó mayor producción de aminoácidos libres, superando al consorcio C (formado por cepas del grupo *L. casei*). Esto sugiere que los otros 4 aislados correspondientes a *E. coli* (11J, 34J y 43J) y *K. pneumoniae* (35F) adaptan su metabolismo a la utilización de aminoácidos libres, lo cual corresponde con lo reportado por Chalova et al. (2009) que reporta la preferencia de péptidos y aminoácidos por *E. coli* en intestino delgado.

Por otra parte, el consorcio M fue el mayor productor de aminoácidos libres totales con un incremento de 7 y 16.5% respecto a los consorcios de mayor producción formados por cepas control (Consortios C y D). Esto sugiere la contribución proteolítica del aislado *K. variicola* en la hidrólisis de la proteína láctea, como se reporta para diversas Enterobacterias (Haddadi et al. 2005; Morales et al. 2006; Tondo et al. 2004). Este fenómeno ha sido reportado para diversos

cultivos mixtos iniciadores usados en alimentos lácteos fermentados (Bergamini et al. 2009; Ong et al. 2006; Settachaimongkon et al. 2014; Shihata and Shah 2000; Yilmaz and Kurdal 2014).

El perfil de aminoácidos libres generado por los diferentes consorcios fue dependiente de su composición, de los cuales destacaron los consorcios M y C. El consorcio M fue el mayor productor de Glu, Met, Ser and Tyr, mientras que en aminoácidos ramificados fue el mayor productor de Leu, con similar producción de Ile y menor de Val respecto al consorcio C. El incremento de aminoácidos de cadena ramificada y Met in productos lácteos fermentados son deseables debido a que sirven como precursores en el desarrollo de compuestos de sabor y aroma (McSweeney et al. 2000). Además, el perfil de aminoácidos generado por el consorcio M resultó diferente a los reportados por otros autores para cepas usadas en cultivos iniciadores (*L. helveticus*, *Lactococcus lactis*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*) used in yogurt and kefir production, superandolos en la producción de Arg, Tyr, Met, Ile and Leu (Germani et al. 2014; Simova et al. 2006). Adicional a esto, el consorcio M resultó ser el mejor productor del aminoácido Glu el cual resulta ser de gran importancia e cultivos iniciadores formados por BAL debido a que al ser incapaces de sintetizar este aminoácido, sirve como precursor en el proceso de transaminación y posterior catabolismo de otros aminoácidos para producción de compuestos de sabor ya aroma (Andersson & Roger, 2003).

6.3 Propiedades probióticas

6.3.1 Tolerancia a pH y crecimiento a diferentes pH

La acidez del estómago corresponde al factor de mayor impacto en la viabilidad de bacterias que son suministradas por vía oral como probióticos (Charteris et al. 1998). El rango de pH del estómago comprende entre 1.0-2.5 en individuos saludables y puede incrementar con la ingesta de alimentos hasta 5.0 dependiendo de los intervalos de alimentación o variabilidad de alimentos, así como de la duración de la ingesta (Evans et al. 1998; Kararli, 1995).

La tolerancia de las cepas control evaluadas en este estudio fue baja, sin embargo el género *Bifidobacterium* spp. destacó respecto a *Lactobacillus* spp. De estas, *B. animalis* fue la única cepa con viabilidad a 180 minutos. Estos resultados corresponden a los reportado por otros

autores en la evaluación de cepas probióticas (Al-Saleh et al. 2006; Balamurugan et al. 2014; Hoque et al. 2010; Maus & Ingham, 2003; Sahadera et al. 2011).

Por otra parte, el aislado 35F correspondiente a una cepa de *K. pneumoniae* fue el único con viabilidad a 90 y 180 minutos, presentando conteos por debajo de *B. animalis*. Este comportamiento resulta similar al reportado por Edelson-Mammel et al. (2006) para tolerancia de diversas cepas de *Enterobacter sakazakii* sometidas a condiciones similares.

De acuerdo con Gomez-Zavaglia et al. (2002) y Pan et al. (2008), el ácido producido en el estómago humano (HCl) es fuertemente oxidante y puede causar alteración de biomoléculas de la célula bacteriana (ácidos grasos, proteínas, colesterol y ADN). Se ha demostrado que la tolerancia a pH es cepa dependiente y se reporta que el incremento de la viabilidad de las cepas probióticas durante el tránsito gástrico se incrementa con ciertos componentes alimentarios, tales como: leche, proteínas de leche, queso, yogurt y extractos de cereales (Chateris et al. 1998; Conway et al. 1987; Charalampopoulos et al. 2003; Gardiner et al. 1999).

Por otra parte, *L. acidophilus* y el aislado 35F presentaron mayor capacidad de adaptación a condiciones ácidas, pues fueron las únicas que crecieron en medio MRS a pH de 4, 5 y 6.5. Se ha demostrado que el contenido de glucosa incrementa significativamente la viabilidad en BAL por medio del suministro de ATP al sistema ATPasa para la excreción de H^+ , manteniendo la homeostasis de pH intracelular y viabilidad celular (Cocoran et al. 2005). De acuerdo a Matsumoto et al. (2004) la expresión de ATPasa en cepas de *Bifidobacterium* ácido tolerantes fue mayor a pH más bajo, en contraste con la cepas menos tolerantes. Además, se ha determinado que la cepa *Bifidobacterium longum* sometida a pH ácido incrementa la expresión de proteínas involucradas en metabolismo de carbohidratos y aminoácidos, resultando en un incremento del flujo glucolítico y liberando amonio intracelular como un mecanismo de regulación de pH (Sánchez et al. 2007).

Por otra parte, el mecanismo de regulación de pH de bacterias entéricas difiere al de probióticas, debido a que inducen descarboxilación de aminoácidos elevando el pH intracelular. Este proceso involucra la descarboxilación del aminoácido y consumo de H^+ , con liberación mediante un sistema simporte que involucra sustrato y producto final de la descarboxilación (Bearson et al. 1997). De acuerdo a Tsuji et al. (1981), Entrobacterias como *E. coli* y *K. pneumoniae* presentan buena capacidad de adaptación a las condiciones ácidas, pues su

crecimiento es poco afectado a pH 5.4. Estos resultados son similares a los obtenidos por los aislados productores de aminoácidos en este estudio.

6.3.2 Tolerancia a bilis y crecimiento a diferentes concentraciones de bilis

Otro factor importante lo constituye la bilis, cuya función fisiológica es emulsificar sustancias liposolubles procedentes de la dieta para facilitar su absorción (Fuchs 2003; Bergley 2005). La bilis está constituida por una mezcla compleja de compuestos orgánicos (sales biliares, colesterol, fosfolípidos, proteínas, entre otros) e inorgánicos (iones de sodio, potasio y cloro) (Bregley et al. 2005). En el ser humano la concentración de sales biliares se encuentra entre 0.3 y 0.5% (Zavaglia et al. 1998; Dunne et al. 2001), y debido a su similitud con la bilis bovina la mayor parte de los ensayos *in vitro* se realizan con soluciones de Oxgall (Guilliland & Walker 1990; Noh & Gilliland, 1993; Chou & Weimer, 1999). Se ha demostrado que el efecto antimicrobiano de la bilis se debe a la capacidad de sus ácidos para penetrar la membrana celular y alterar su integridad, afectando el gradiente de concentración de iones y provocando fuga de otros componentes celulares dando como resultado la muerte celular (Kurdi 2006). Además se ha reportado daño oxidativo de ADN por parte de los ácidos biliares (Merritt & Donaldson, 2009).

Las cepas evaluadas en este estudio fueron sometidas a concentraciones de bilis, dispersas tanto en solución de fosfatos como en medio MRS a tiempos finales de 8 y 24 h respectivamente. De las dos condiciones la bilis presentó un efecto más letal en medio MRS para todas las cepas, con inhibición de cuatro de los aislados.

En solución de fosfatos el comportamiento fue similar a las condiciones evaluadas, presentando baja letalidad para la mayoría de las cepas. Estos resultados sugieren que los componentes mayoritarios del contenido biliar (ácido cólico y desoxicólico) en solución acuosa presentan un PKa de 5.05 y 5.06, los cuales están por debajo del pH de la solución de fosfatos, resultando en contenido alto de moléculas ionizadas con un efecto bactericida en cepas de menor tolerancia (Cantafora & Di Biase 1987; Carey 1984). Al incrementar la concentración de Oxgall y mantener el pH de la solución de fosfatos no incrementó la cantidad de moléculas protonadas, limitando su efecto antibacteriano por la incapacidad de penetrar las membranas celulares. Esto se ve reflejado en el comportamiento similar de las cepas a las concentraciones evaluadas (Kurdi & 2000, 2003).

En contraste con la solución de fosfatos, en medio MRS la actividad metabólica de las cepas provoca la acidificación del medio como resultado de la producción de ácidos orgánicos a partir de la fermentación de la glucosa, incrementando la protonación de ácidos biliares y por lo tanto su letalidad. Sin embargo, se ha demostrado que cepas de *Lactobacillus* (Bateup et al. 1995; De Smet 1995) y *Bifidobacterium* (Grill et al. 1995; Kim et al. 2004) presentan actividad hidrolasa de sales biliares y se ha relacionado a mecanismo de desintoxicación celular, persistencia en tracto gastrointestinal, rol nutricional, tolerancia a bilis y lisozima (Bergley et al. 2006). Además, en bacterias Gram positivas como *Bacillus cereus* la presencia de bilis indujo la expresión de genes involucrados en protección oxidativa (superóxido dismutasa y tiorredoxinas) y varias chaperonas (Merritt & Donaldson, 2009).

Por otro lado, en bacterias entéricas se ha reportado la expresión del operón *marRAB* bajo condiciones de bilis. Se ha propuesto que este operón incrementa la expresión de bombas de excreción de ácidos biliares, reduce la expresión de porinas que permiten el paso de ácidos biliares e incrementa la expresión de enzimas relacionadas a reparación de ADN dañado por estrés oxidativo (Merritt & Donaldson, 2009).

El incremento de densidad óptica en los cultivos de MRS a concentraciones mayores de bilis podría explicarse por el hecho que los ácidos biliares podrían ser utilizados como nutrientes, incrementando la densidad del cultivo (Bergley et al. 2006). Estos resultados corresponden a los reportados por Al-Saleh en 2006, donde cepas de *Bifidobacterium* incrementaron su crecimiento estimuladas a concentraciones mayores de bilis.

Finalmente, los valores reportados para las diferentes secciones del intestino delgado comprende 5-7 para duodeno, 6-7 para yeyuno y 7 para íleon (Evans et al. 1988; Kararli 1995), sugiriendo que a condiciones fisiológicas la letalidad de los ácidos biliares podría ser menor en comparación a las condiciones evaluadas en este estudio.

6.3.3 Tolerancia a lisozima

La lisozima es una proteína globular básica conformada por una cadena polipeptídica de 129 aminoácidos, en la cual el aminoácido Lys está localizado en el extremo N-terminal y Leu en el carboxilo terminal, contiene cuatro puentes bisulfuro y seis estructuras α -hélice (Cegielska-Radziejewska et al. 2008). Se presenta en la mayor parte de los fluidos corporales

en concentraciones variables que van desde 7-13 $\mu\text{g/mL}$ en suero, 8 veces la concentración en jugo gástrico y 120 veces en lágrimas (Hankiewicz & Swierczek, 1974). En tracto gastrointestinal se produce por diferentes células: en estómago es secretada por células epiteliales, glándulas pilóricas y glándulas del fondo, en intestino delgado por células de Paneth y en glándulas de Brunner y en colon se produce en células de las criptas (Saito et al. 1988).

La lisozima en el cuerpo humano está asociada con inmunidad innata y forma parte de la primera línea de defensa contra infecciones. La principal función de esta proteína es antimicrobiano mediante la hidrólisis de N-acetil murámico de la pared celular, siendo efectiva contra bacterias Gram positivas (Cegielska-Radziejewska et al. 2008).

Algunos autores incluyen la tolerancia a lisozima como una prueba adicional para evaluar la capacidad funcional de probióticos, debido a que lo relacionan como una característica de adaptación de las bacterias al tracto gastrointestinal (García-Ruíz et al. 2014; Köll et al. 2008, Zinedine & Faid, 2007).

Con excepción de *B. breve* y *L. acidophilus* las cepas evaluadas en este estudio mostraron tolerancia a lisozima. Esto sugiere una ventaja adicional para adaptarse al contenido luminal del tracto gastrointestinal y corresponde con otros estudios donde se han reportado cepas probióticas tolerantes a concentraciones similares a las fisiológicas y mayores (García-Ruíz et al. 2014; Köll et al. 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio fueron opuestos a los reportados por Zinedine & Faid en 2007, donde cepas de *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium bifidum* presentan mortalidad entre 65.6 y 95% a concentración de 500 $\mu\text{g/mL}$.

Finalmente, a diferencia de las cepas control los aislados no son susceptibles al efecto de la lisozima, esto debido a su estructura celular que presencia de una capa externa compuesta de lipoproteína y una capa media compuesta de lipopolisacarido que sirven de protección a la pared celular (Noller & Hartsell, 1960).

6.3.4 Compatibilidad entre cepas y actividad antimicrobiana

Una de las mayores aplicaciones de los probióticos es mantener el balance de la flora intestinal, evitando la invasión de microorganismos patógenos en el tracto gastrointestinal (Naidu et al. 2012). Esto es llevado a cabo a través de varios mecanismos, donde la producción

de metabolitos intestinales, tales como: bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y ácidos orgánicos juegan un papel importante (Gogineni et al. 2013; Saranraj et al. 2013).

En este estudio, la actividad antibacteriana de las cepas evaluadas fue debido a los ácidos orgánicos producidos, debido a que el sobrenadante libre de células neutralizado no presentó inhibición ante las cepas patógenas. El efecto inhibitorio fue dependiente de la cantidad de ácido láctico y ácido acético, así como del pH del sobrenadante no neutralizado, sobresaliendo cepas control del grupo *Bifidobacterium*. Estos resultados corresponden a los reportados por otros autores (Belicová et al. 2013; Medini & Hassouna 2009; Zago et al. 2011; Zhang et al. 2011). Además, se sustentan con los reportados por Ioui (2012), Pan (2009), Zinedine & Faid (2007) en donde el sobrenadante libre de células neutralizado de BAL mantiene efecto inhibitorio ante bacterias Gram negativas.

Se ha demostrado que la forma protonada de los ácidos orgánicos difunde pasivamente a través de la membrana celular, afectando el gradiente electroquímico de protones y la permeabilidad, lo cual conduce a la muerte celular (Kashket 1987; Snijders et al. 1985). Además, un pH cercano al pKa de los ácidos orgánicos mantiene un alto nivel de moléculas no disociadas e incrementa su efecto antagónico y letalidad (Lindgren & Dobrogosz 1990). Esto explica el efecto de los sobrenadantes obtenidos de las cepas control, cuyo pH resultó cercano al pKa de los ácidos secretados.

Por otra parte, los aislados no presentaron efecto inhibitorio ante las cepas patógenas, esto debido a la baja producción de ácidos orgánicos y alto pH.

6.4 Potencial uso en alimentos fermentados

6.4.1 Cambio de pH y células viables

La producción industrial de alimentos lácteos fermentados está basada en el uso de cultivos iniciadores estándar, en los cuales las cepas que los forman deben poseer ciertas características de interés, tales como: elevada velocidad de crecimiento, competitividad en cultivos mixtos, buena adaptación al sustrato, propiedades antimicrobianas o capacidades metabólicas que afecten positivamente las características organolépticas del producto fermentado (Heller et al. 2001). En cultivos mixtos la eficiencia está determinada por la compatibilidad entre cepas y su complementación metabólica, lo cual se refleja en una mayor

velocidad de acidificación y aceleración del proceso fermentativo (Leroy & De Vuyst 2004). Esto corresponde con los resultados obtenidos en este estudio donde las cepas control no presentaron efecto antagónico y en consorcio incrementaron la velocidad de acidificación, resultando en un pH más bajo. Se reporta que la secreción de ácidos orgánicos y reducción del pH representa el principal mecanismo de inhibición de microorganismos alterantes en el proceso de alimentos fermentados. Esto explica el efecto inhibitorio observado en *K. variicola* dentro del consorcio M y corresponde con lo reportado para diversas Enterobacterias consideradas como microorganismos control (Belicová et al. 2013; Zhang et al. 2011). *K. variicola* mantuvo la mayor viabilidad a 24 y 48 h de fermentación y se reporta la capacidad de esta cepa a tolerar variaciones de pH en un rango de pH entre 4-9. Además se reporta que en alimentos lácteos fermentados de manera artesanal el contenido de Enterobacterias en el proceso es significativo ($10^3 - 10^4$ cfu/mL) (Akabanda et al. 2010; Savadogo et al. 2004). La tolerancia de estos microorganismos a las condiciones ácidas del alimento se ven incrementadas debido al efecto protector de ciertos componentes propios del alimento, tales como la proteína láctea (Chateris et al. 1998).

6.4.2 Producción de compuestos volátiles

Los volátiles generados por los consorcios microbianos evaluados, así como el monocultivo de *L. acidophilus* ha sido previamente caracterizados en productos lácteos fermentados. Sin embargo, la producción de 2,3-butanediol, 4-metil-2-hexanona y octanol producidos por el Consorcio M son distintivos respecto a los perfiles de los consorcios y productos comerciales evaluados y son considerados importantes en el sabor y aroma de este tipo de productos fermentados (Longo et al. 2006). La producción de estos volátiles es el resultado de la contribución metabólica de *K. variicola*, la cual posee la vía metabólica activa para la producción de acetoina y 2,3-butanediol a partir de piruvato y se relaciona a la capacidad fermentativa de citrato y azúcares fermentables (Bandell et al. 1998; Liu et al. 2016). Estudios previos reportan la producción de etanol, acetoina, diacetil y 2,3-butanediol por Enterobacterias con capacidad de degradar citrato, mientras que en BAL la producción de acetoina es limitada a sólo algunas cepas de *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* y *Lactobacillus* spp. (Chávez-López et al. 2006; Rademaker et al. 2007).

Dentro del Consorcio M la cepa *K. variicola* contribuyó considerablemente al incremento de acetoina, ácido acético, hexanoico y octanoico, así como a 2-nonanona. La acetoina, etanol y ácidos acético son considerados de importancia en el sabor y aroma de yogurt, kefir y diversos tipos de queso (Beshkova et al. 2003; Milesi et al. 2010; Routary & Mishara 2011). El perfil metabólico generado con la adición de *K. variicola* es diferente al reportado para otras Enterobacterias en queso fresco (Morales et al. 2006).

Los perfiles volátiles obtenidos en este estudio presentan mayor diversidad de compuestos y composición distintiva que los reportados por Iličić et al. (2012) para cultivos iniciadores funcionales formados por cepas *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* y *S. thermophilus*, las cuales fueron aplicadas a quesos y cuyo perfil de volátiles estuvo ampliamente representado por cetonas, aldehídos e hidrocarburos. Sin embargo, Pan et al (2014) y Yüksel and Bakırcı (2015) reportan resultados similares a los obtenidos en este estudio, donde en fermentación de leche por *L. pentosus* se obtuvo elevada concentración de etanol y ácido acético, así como similitud en el perfil obtenido por cultivo iniciador mixto formados por *L. acidophilus*, *S. thermophilus* y *Bifidobacterium* aplicado a la elaboración de yogurt.

7. CONCLUSIÓN

En el tracto gastrointestinal de infantes lactantes están presentes bacterias cultivables con capacidad de producción de aminoácidos ramificados. Sin embargo, la capacidad metabólica específica de cepa, las condiciones de fermentación y la complementación microbiana en consorcios determinan la dirección cualitativa y cuantitativa de producción de aminoácidos ramificados. Basado en los resultados *in vitro* obtenidos en este estudio, se sugiere que el consorcio M constituye una potencial alternativa en la producción de alimentos lácteos fermentados con propiedades funcionales al incrementar la biodisponibilidad de aminoácidos de cadena ramificada (Ile y Leu) a partir de la proteína láctea. Esto sugiere que la ingesta de alimentos lácteos fermentados por este consorcio contribuirá en la mejora del estado nutricional del individuo a través del mantenimiento de la masa muscular. Además, de acuerdo al perfil distintivo de compuestos volátiles generado por este consorcio, las características sensoriales particulares generadas proveen una alternativa más dentro de los productos comerciales disponibles en el mercado.

8. PERSPECTIVAS

1. Determinar la posible patogenicidad del aislado seleccionado (*K. variicola*).
2. Determinar la funcionalidad del consorcio M *in vivo* en animales modelo.
3. Determinar grado de hidrólisis de proteína láctea y eficiencia de biodisponibilidad de aminoácidos ramificados.
4. Evaluar persistencia en tacto gastrointestinal *in vivo*.
5. Evaluar indicadores inflamatorios (citosinas) en suplementación *in vivo*.
6. Aplicar el consorcio microbiano en la producción de alimentos lácteos fermentados y realizar una evaluación sensorial con panel de catadores.

9. REFERENCIAS

- Adibi, S. 1976. Metabolism of Branched-chain amino acids in altered nutrition. *Metabolism*. 25:1287-1302.
- Akabanda, F., Owusu-Kwarteng, J, Glover, R.L.K., Tano-Debrah, K. 2010. Microbiological Characteristics of Ghanaian Traditional Fermented Milk Product, Nunu. *Nature and Science* 8:178-187.
- Al-Saleh, A.A., Metwalli, A.A.M., Abu-Tarboush, H.M. 2006. Bile and acid tolerance and Cholesterol removal from media by some lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *J. Saudi Soc. For Food and Nutrition*. 1:1-16.
- Alterman, E., Russel, W.M., Azcarate-Peril, M.A., Barrangou, R., Buck, B.L., McAuliffe, O., Souther, N., Dobson, A., Callanan, M., Sonja, Lick., Hamrick, A., Cano, R., Klaenhammer, T.R., 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102, 3906-3912.
- Aristoy, C.M., Toldra, F. 1991. Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.* 39:1792-1795.
- Azcarate-Peril, M.A., Tallon, R., Klaenhammer. 2009. Temporal gene expression and probiotic attributes of *Lactobacillus acidophilus* during growth in milk. *J. Dairy Sci.* 92:870–886.
- Balamurugan, R., Chandragunasekaran, A.S., Chellappan G., Rajaram, K., Ramamoorthi, G., Ramakrishna, B.S., 2014 Probiotic potential of lactic acid bacteria present in homemade curd in southern India. *Indian Journal of Medical Research* 140, 345-355.
- Bateup, J. M., M. A. McConnell, H. F. Jenkinson, and G. W. Tannock. 1995. Comparison of *Lactobacillus* strains with respect to bile salt hydrolase activity, colonization of the gastrointestinal tract, and growth rate of the murine host. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1147–1149.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H., Davies, A. 2011. The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry. *ILSI Europe*. 1-48.
- Belicová, A., Mikulášová, M., Dusinsky, R., 2013. Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus Plantarum* from Slovak Bryndza Cheese. *BioMed Research International* 1, 1-8.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. 1997. Acid stress responses in Enterobacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 147:173-180.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Zalazar C.A., 2006. Influence of probiotic bacteria on the proteolysis profile of semi-hard cheese. *International Dairy Journal* 16, 856-866.
- Bergamini, C.V., Hynes, E.R., Palma, S.B., Sabbag, N.G., Zalazar, C.A., 2009. Proteolytic activity of three probiotic strains in semi-hard cheese as single and mixed cultures: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. *International Dairy Journal* 19, 467-475.

- Bergamini, C., Hynest, E., Meinardi, C., Suárez, V., Quiberoni, A., 2010. Pategrás cheese as a suitable carrier for six probiotic cultures. *Journal of Dairy Research* 77, 265-272.
- Beshkova, D.M., Simova, E.D., Frengova, G.I., Simov, Z.I., Adilov, E.F., 1998. Production of Amino Acids by Yogurt Bacteria. *Biotechnology Progress* 14, 963-965.
- Bergley, M., Gahan, C.G.M., Hill, C., 2005. The interaction between bacteria and bile. *FEMS Microbiology Reviews* 29, 625-651.
- Bergley, M., Hill, C., Cormac, G.M. 2006. Bile salt hydrolase activity in Probiotics. *Applied and environmental microbiology*. 72:1729-1738.
- Blaut, M., Clavel, T. 2007. Metabolic Diversity of the Intestinal Microbiota: Implications for Health and Disease. *J Nutr*. 137:715-755.
- Bhaskar, P.T., Hay, N. 2007. The two TORCs and Akt. *Dev. Cell*. 12:487-502.
- Blinder, E., Bermúdez-Silva, F.J., André, C., Elie, M., Romero-zarbo, S.Y., Lester-Lasserre, T., Belluomo, L., Duchampt, A., Clark, S., Aubert, A., Mezzullo, M., Fanelli, F., Pagotto, U., Layé, S., Mithieux, G., Daniela, C. 2013. Leucine Supplementation Protects from Insulin Resistance by Regulating Adiposity Levels. *PLOS ONE*. 8: 1-12.
- Bidlingmeyer, B.A., Cohen S.A. y Tarvin T.L. Rapid Analysis of Amino Acids using Pre-column Derivatization. 1984. *J Chromatogr*. 336: 93-104.
- Brenner, D.J., krieg, N.R., Staley, J.R. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. New York, Springer.
- Burns, P., Cuffia, F., Milesi, M., Vinderola, G., Meinardi, C., Sabbag, N., Hynes, E., 2012. Technological and probiotic role of adjunct cultures of non-starter lactobacilli in soft cheese. *Food Microbiology* 30, 45-50.
- Cai, H., Thompson R., Budinich M.F., Broadbent J.R., Steele J.L., 2009. Genome sequence and comparative analysis of *Lactobacillus casei*: insights into Niche-Associated Evolution. *Genome Biology Evolution* 1, 239-257.
- Calvo, J.M., Matthews, R.G. 1994. The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. 58:466-490.
- Camilli, A., Bassler, B.L. 2006. Bacterial small-molecule signaling pathways. *Science*. 311:1113-1116.
- Cantafora, A., Di Biase, A., 1987. Study of biologically relevant physical-chemical properties of bile salts by reverse-phase liquid chromatography. *Chromatographia* 24, 277-281.
- Carey, M.C., 1984. Bile acids and bile salts: ionization and solubility properties. *Hepatology* 4, 66S-71S.
- Castañeda C. 2002. Muscle wasting and protein metabolism. *J. Anim. Sci*. 80:98-105.
- Casto L.A. y de Robeto C. Probióticos: utilidad clínica. *Colomb Med*. 2006; 37(4):308-314.

- Cegielska-Radziejewska, R., Leśnierowski, G., Kijowski, J. 2008. Properties and application of egg white lysozyme and its modified preparations-A review. *Pol. J. Food. Nutr. Sci.* 58:5-10.
- Chambellon, E., Yvon, M. 2003. CodY-regulated aminotransferases AraT and BcaT play a major role in the growth of *Lactococcus lactis* in milk by regulating the intracellular pool of amino acids. *Appl. Environ Microbiol.* 69:3061-3068.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S., Webb, C., 2003. Evaluation of the effect of malt wheat and barley extracts on the viability of potential probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. *International Journal of Food Microbiology* 82, 133-141.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K., 1998. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology* 84, 759-768.
- Corcoran, B.M., Stanton, C., Fitzgerakd, G.F., Ross R.P., 2005. Survival of Probiotic *Lactobacillus* in Acidic Environments is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 3060-3067.
- Conway, P.L., Gorbach, S.L., and Goldin, B.R., 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *Journal of Dairy Science* 70, 1-12.
- Crow, V., Curry, B. and Hayes, M., 2001. The ecology of non-estarter lactic acid bacteria (NSLAB) and their use as adjuncts in New Zealand Cheddar. *International Dairy Journal* 11, 275-283.
- Cueto-Vigil, C., Acuña-Monsalve, Y., Valenzuela-Riaño, J., 2010. Evaluación *in vitro* del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas de suero costeño. *Actual Biol.* 32:129-138.
- De Angelis M., Gobbetti M. 2011. *Lactobacillus* spp.: General Characteristics. University of Bari, Bari, Italy. 3, 1479-1484.
- De Brandt, J.P., Cynober, L. 2006. Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function, and application. *Journal of Nutrition.* 308S-313S.
- De Smet, I., L. Van Hoorde, M. Vande Woestyne, H. Christiaens, and W. Verstraete. 1995. Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 79:292-301.
- De Vrese M., Marteau P.R. 2007. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. *J nutr.* 137.803-811.
- Den Hengst, D.C., van Huijsum, S.A.F.T., Geurts, J.M.W., Nautas, A., Kok, J., Kuipers, O.P. 2005. The *Lactococcus lactis* CodY regulon identification a conserved cis-regulatory element. *The Journal of Biological Chemistry.* 280:34332-34342.
- Desgarenes, D., Garrido, E., Torres-Gomez, M.J., Peña-Cabriales, J.J. Partida-Martínez, L.P. 2014. Diazotrophic potential among bacterial communities associated with wild and cultivated Agave species. *FEMS Microbiology Ecology.* 90:844-857.

- Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin, correlation with in vivo findings. *American Journal of Clinical Nutrition* 73, 386S-392S.
- Dvorkin, M.A., Cardinali, D.P. 2003. *Best & Taylor Bases fisiológicas de la práctica médica*. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 553-554.
- Edelson-Mammel, S., Porteous, M.K., Buchanan, R.L. 2006. Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of the habituating the cell to an acidic environment. *Food Microbiology and safety*. 71:201-207.
- Eley, H.L., Russell, T., Tisdale, M.J. 2007. Effect of branched-chain amino acids on muscle atrophy in cancer cachexia. *Biochem. J.* 407: 113-120.
- Epelbaum, S. Larosa, R.A., Vandyk, T.K. 1998. Branched-Chain Amino Acid Biosynthesis in *Salmonella typhimurium*: a Quantitative Analysis. *Journal of bacteriology*. 180:4056-4067.
- Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A.G., Dyson, T.J., Hardcastle, J.D. 1998. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29, 1035-1041.
- Fang, G., Konings, W.N. Poolman, B. 2000. Kinetics and substrate specificity of Membrane-Reconstituted peptide transporter DtpT of *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 182:2530-2535.
- FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Report of a joint. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London Ontario, Canada. 2002.
- Fortiadis, C.I., Stoidis, C.N., Spyropoulos, B.G. 2008. Role of probiotics, prebiotics and symbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 14:6453-6457.
- Fuchs, M. 2003. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology* 284, 551-557.
- Garault, P., Letort, C., Juillard, V. & Monnet, V. 2000. Branchedchain amino acid biosynthesis is essential for optimal growth of *Streptococcus thermophilus* in milk. *Appl Environ Microbiol* 66:5128-5133.
- Chou, L., Weimer, B., 1999. Isolation and characterization of acid and bile tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of dairy Science* 82, 23-31.
- Godon, J.J., Chopin, M.C., Ehrlich, S.D. 1992. Branched-chain amino acids biosynthesis genes in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Journal of Bacteriology*. 174:6580-6589.
- Gogineni, V.K., Lee, E., Morrow, L.E., Malesker, M.A. 2013. Probiotics: Mechanisms of action and clinical applications. *Probiotics & Health* 1:1.
- Goktepe I., Juneja V.K., Ahmedna M. *Probiotics in Food Safety and Human Health*. Taylor and Francis. 2006; 494 p.

- Gómez-Zavaglia, A., Kociubinski, G., Pérez, P., Disalvo, E., De Antoni, G. 2002. Effect of bile on the lipid composition and surface properties of Bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 93:794–799.
- Guadichon, C., Mahe, S., Benamouzing, R., Luengo, C., Fouillet, H., Dare, S., Van Oyccke, M., Ferriere, F., Rautureau, J., Tomé, D. 1999. Net postprandial utilization of ¹⁵[N]-labeled milk protein nitrogen in influenced by diet composition of humans. *Journal of Nutrition*. 129:890-895.
- Guarner F. y Managelada J.R. 2003. La flora bacteriana del tracto digestivo. *Gastroenterol Hepatol*. 26 suppl 1:1-5.
- Guédon, E., Serror, P., Ehrlich, S.D, Renault, P., Delorme, C. 2001. Pleiotropic transcriptional repressor CodY senses the intracellular pool of branched-chain amino acids in *Lactococcus lactis*. *MOI Microbiol*. 40:1227-1239.
- Guilliland, S.E., Walker, K., 1990. Factors to consider when selecting a culture of *Lactobacillus acidophilus* as a dietary adjunct to produce a hypocholesterolemic effect in human. *Journal of Dairy Science* 73, 905-911.
- Grill, J. P., Maginot-Durr, C., F. Schneider, F. and Ballongue, J. 1995. Bifidobacteria and probiotic effects: action of *Bifidobacterium* species on conjugated bile salts. *Curr. Microbiol*. 31:23–27.
- Gupta, S.S., Mohammed, M.H., Ghosh, T.S., Kanungo, S., Nair, G.B., Mande, S. 2011. Metagenome of the gut of a malnourished child. *Gut Phatogens*. 3:1-9.
- Haddadi, K., Moussaoui, F.H., Laurent, F., LeRoux, Y. 2005. *E. coli* proteolytic activity in milk and casein breakdown. *Reprod. Nutr. Dev*. 45:485-496.
- Hankiewicz, J., Swierczek, E. 1974. Lysozyme in human body fluids. *Clinica Chimica Acta*. 57:205-209.
- Hart, A.L., Kamm, M.A., Stagg, A.J., Knight, S.C. 2009. Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. *Inflamm Bowel Dis*. 15:300-10.
- Havenaar, R., Ten Brink, B., Huis in't Veld, J.H.J. 1992. Selection of strains for probiotic use. In: Fuller R, ed. *Probiotics: the scientific basis*. London: Chapman and Hall. 209–24.
- Hermann T. 2003. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol*. 104:155-172.
- Hong, H.A., To, E., Fakhry, S., Baccigalupi, L., Ricca, E., Cutting, S.M. 2009. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Res Microbiol*. 160:375-379.
- Hoque, M.Z., Akter, F., Hossain, K.M., Rahman, M.S.M., Billah, M.M., Islam, K.M.D. 2010. Isolation, identification and analysis of probiotics properties of *Lactobacillus* spp. from selective regional yoghurts.
- Hwan P.J and Yup L.S. 2010. Metabolic pathways and fermentative production of L-aspartate family amino acids. *Biotechnol. J*. 5:560-577.

Ikeda M. 2003. Amino acid production processes. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 79:1-35.

Iličić, M.D., Milanović, S.D., Carić, M.D., Kamurić K.G., Vurić, V.R., Hrnjez D.V., Ranogajec, M.I., 2012 Volatile compounds of functional dairy products. *AFTEFF* 43, 11-17.

Ioui, T. 2012. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from human gut. *The Online Journal of Science and Technology*. 2:47-51.

Ismail A, Ktari L, Ahmed M, Bolhuis H, Boudabbous A, Stal LJ, Cretoui S, El Bour M (2016) Antimicrobial activities of bacteria associated with the brown alga *Padina pavonica*. *Frontiers in Microbiology*.

Jacobson, L. 1999. Lower Weight Loss and Food Intake in Protein-Deprived, Corticotropin Releasing Hormone-Deficient Mice Correlate with Glucocorticoid Insufficiency. *Endocrinology*. 140:3543-3551.

Jain, P.K., McNaught, C.E., Anderson, A.D., MacFie, J., Mitchell, C.J. 2004. Influence of synbiotic containing *Lactobacillus acidophilus* La5, *Bifidobacterium lactis* Bb 12, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* and oligofructose on gut barrier function and sepsis in critically ill patients: a randomised controlled trial. *Clin Nutr*. 23:467-75.

Kararli, T., 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics and Drugs Disposition* 16, 351-380.

Kashket, E.R., 1987. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Reviews* 46, 233–244.

Kaurt I.P., Chopra K and Amarpreet S. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. *European J Pharma Sci*. 15:1-9.

Kerstetter, J.E., O'Brien, O., Insogna, K.L. 2003. Low Protein Intake: The Impact on Calcium and Bone Homeostasis in Humans. *The Journal of Nutrition*. 855S-861S.

Kim, G. B., S. H. Yi, and B. H. Lee. 2004. Purification and characterization of three different types of bile salt hydrolase from *Bifidobacterium* strains. *J. Dairy Sci*. 87:258–266.

Kinoshita, S., Nakayama, K. 1978. *Economic microbiology volume 2: Primary products of metabolism*. ACADEMIC PRESS. New York. 230-235.

Kleerebezem, M., Boekhorst, L., van Kranenburg, R., Molenaar, D., Kuipers, O.P., Leer, R., Turchini, R., Peters, S.A., Sandbrink, H.M., Fries, M.W., Stiekema, W., Lankhorts, R.M., Bron, P.A., Hoffer, S.M., Groot, M.N., Kerkhove, R., Ursing, B., de Vos, W.M., Siezen, R.J., 2003. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* 100, 1990-1995.

Köll, P., Mändar, R., Marcotte, H., Leibur, E., Mikelsaar, M., Hammarström, L. 2008. Characterization of oral Lactobacilli as potential probiotics for oral health. *Oral Microbiology Immunology*. 23:139-147.

Kotzampassi, K., Giamarellos-Bourboulis, E.J., Vondouris, A., Kazamias, P., Eleftheriadis, E. 2006. Benefits of a Synbiotic Formula (Synbiotic 2000Forte®) in Critically Ill Trauma Patients: Early Results of a Randomized Controlled Trial. 30:1848-1855.

Kurakawa, K., Itoh, T., Kurakawa, T., Oshima, K., Toh, H., Toyoda, A., Takami, H., Morita, H., Sharma, V.K., Taylor, T.D., Noguchi, H., Mori, H., Ogura, Y., Ehrlich, D.S., Itoh, K., Takagi, T., Sakaki, Y., Hayashi, T., Hattori, M. 2007. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. DNA Research. 14:169-181.

Kurdi, P., van Veen, H.W., Tanaka, H., Mierau, I., Konings, W.N., Tannock, G.W., Tomita, F., Yokota, A., 2000. Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane ΔpH , in many lactobacilli. Journal of Bacteriology 182, 6525-6528.

Kurdi, P., Tanaka, H., van Veen, H.W., Asano, K., Tomita, F., Yokota, A., 2003. Cholic acid accumulation and its disimintion by short-chain acids in Bifidobacteria. Microbiology 149, 2031-2037.

Laakson, K., Koskenniemi, K., Koponen, J., Kankainen, M., Surakka, A., Salusjärvi, T., Auvinen, P., Savijovi, K., Nyman, T.A., Kalkkinen, N., Tynkkynen, S., Varmanen, P. 2011. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. Microbial Biotechnology. 4:746-766.

Larsen, N., Vogensen F.K., van den Berg, F.W.J., Nielsen, D.S., Andreasen, A.S., Pedersen, B.K., Al-Soud, W.A., Sorensen S.J., Hansen, L.H., Jakobsen, M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 3 diabetes differs from non-diabetic adults. PLoS ONE. 5:1-9.

Lawther, R.P., Wek, R.C., Lopes, J.M., Pereira, R., Taillon, B.E., Hatfield, G.W. 1987. The complete nucleotide sequence of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli* K-12. Nucleic Acids Res. 15:2137-2155.

Lee J y O'Sullivan D. 2010. Genomic Insights into Bifidobacteria. Microbiology and Mol Biol Reviews. 74:378-416.

Macfarlane, G.T., Allison, C., Gibson, S.A.W., Cummings, J.H. 1988. Contribution of the microbiota to proteolysis in the human large intestine. Journal of Applied Bacteriology. 64:37-46.

Leroy, F., De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci Technol 15:67-78.

Liu, M., Bayjanov, J.R., Renckens, B., Nauta, A., Siezen, R.J. 2010. The proteolytic system of lactic acid bacteria revisited: a genomic comparison. BMC Genomics 11:36.

Liu, W., Wang, Q., Hou, J., Chen-Tu, C., Luo, Y., Christie, P. 2016. Whole genome analysis of halotolerant and alkalotolerant plant growth-promoting rhizobacterium *Klebsiella* sp. D5A. Nature Scientific Reports. 6:26710.

Macfarlane, G.T., Cummings, J.H., Macfarlane, S., Gibson, S.A.W. 1989. Influence of retention time of degradation of pancreatic enzymes by human colonic bacteria grown in a 3-stages continuous culture system. Journal of Applied Bacteriology. 67:520-527.

- Magasanik B. 1996. Regulation of nitrogen utilization. In Neidhardt FC, Curtiss R, III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaecter M, Umbarguer HE (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC. 1344-1356p.
- Marchesini, G., Marzocchi, R., Noja, M., Bianchi, G. 2005. Branched-Chain Amino Acid Supplementation in Patients with Liver Diseases. *Journal of Nutrition*. 1596S-1601S.
- Merrit, M.E., Donaldson J.R. 2009. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. 58:1533-1541.
- Marugg, J.D. Meijer, W., Van Kranenburg, R., Laverman, P., Bruinenberg, P.G., De Vos, Willem. 1995. Medium-Dependent Regulation of Proteinase Gene Expression in *Lactococcus lactis*: Control of Transcription Initiation by Specific Dipeptides. *Journal of Bacteriology*. 177:2982-2989.
- Matarese L.E., Gottschlich M.M. *Nutrición Clínica Práctica*. 2ª ed. Madrid, España. Elsevier. 2004.
- Matsumoto, M., Ohishi, H., Benno, Y. 2004. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *International Journal of Food Microbiology*. 93:109-113.
- Matteuzzi, D., Emaldi, O., Selli, A. 1976. *European Journal of Applied Microbiology*. 2:185-194.
- Maughan, H., Van der Auwera. 2011. Bacillus taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection Genetics and Evolution*. 11:789-797.
- Maurizi, R. 1992. Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*. *Experientia*. 48:178-201.
- McSweeney, P.L.H., Sousa, M.J. 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* 80:293-324.
- Medini, E.M., Hassouna M., 2009. Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. *Meat Science* 81, 203–208.
- Meijer, W., Marugg, J.D., Hugenholtz, J. 1996. Regulation of proteolytic enzyme activity in *Lactococcus lactis*. *Journal of Applied and Environment Microbiology*. 177:2982–2989.
- Merrick, M.J., Eduards, R.A. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiology Review*. 59:604-622.
- Merrit, M.E., Donaldson J.R. 2009. Effect of bile salts on the DNA and membrane integrity of enteric bacteria. *Journal of Medical Microbiology*. 58:1533-1541.
- Metges, C.C., Petzke, K.J., El-Khoury, A.E., Henneman, L., Grant, I., Bedri, S., Regan, M.M., Fuller, M.F., Young, V.R. 1999. Incorporation of urea and ammonia nitrogen into ileal and fecal microbial proteins and plasma free amino acids in normal men and ileostomates. *Am J Clin Nutr*. 70:1046-58.
- Mierau, I., Kunji, E.R.S., Venema, G., Kok, J. 1997. Casein and peptide degradation in lactic acid bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 14:279-301.
- Michaelidou, A., Katsiari, M.C., Voutsinas, L.P., Kondyli, E., Alichanidis, E., 2003. Effect of commercial adjunct cultures on proteolysis in low-fat Kefalograviera type cheese. *International Dairy Journal* 13, 473-753.

- Milesi, M.M., Vinderola, G., Sabbag, N., Meinardi, C.A., Hynes, E., 2009. Influence on cheese proteolysis and sensory characteristics of non-starter lactobacilli strains with probiotic potential. *Food Research International* 42, 1186-1196.
- Miller, C. G. 1975. Peptidases and proteases of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Annu. Rev. Microbiol.* 29:485-504.
- Molin G., Bjarred S.E., Ahrne S., Jeppsson B. y Probi A.B. Strains of *Bifidobacterium* having the ability to produce glutamine. United States Patent. 7,947, 482. May. 24, 2011.
- Moat A.G., Foster J.W. y Spector M.P. 2002. *Microbial Physiology*. 4th ed. Wiley-Liss. USA.
- Morishita T., Deguchi Y., Yajima M., Sakurai T. y Yura T. 1981. Multiple nutritional requirements of lactobacilli: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways. *J Bacteriol.* 148:64-71.
- Mozzi, F., Raya, R.R., Vingolo, G.M. 2010. *Biotechnology of Lactic Acid Bacteria: Novel Applications*. Editorial Office. USA. 16-18.
- Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K.M., Kennelly, P.J., Rodwell, V.W., Weil, P.A. 2013. *HARPER Bioquímica Ilustrada*. McGraw Hill. México, D.F. 17-28.
- Naidu, K.S.B., Adam, J.K., Gobender, P., 2012. The use of probiotic and safety concerns: A review. *African Journal of Microbiology Research* 6, 6871-6877.
- Noh, D.O., Guilliland, S. E., 1993. Influence of bile on cellular integrity and beta-galactosidase activity of *L. acidophilus*. *Journal of Dairy Science* 76, 1253-1259.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Wilson, D. 2005. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 431-438.
- Noller, E.C., Hartsell, S.E. 1960. Bacteriolysis of enterobacteriaceae. II. Pre-and co-lytic treatments potentiating the action of lysozyme. *Arch Biochem Biophys.* 53:402-410.
- Odunfa, S.A., Adeniran, S.A., Teniola, O.D., Nordstrom. 2001. Evaluation of lysine and methionine production in some lactobacilli and yeasts from Ogi. *International Journal of Food Microbiology.* 63:159-163.
- Ong, L., Henriksson, A. and Shah, N.P., 2006. Development of probiotic Cheddar cheese containing *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei* and *Bifidobacterium* spp. and the influence of these bacteria on proteolytic patterns and production of organic acid. *International of Dairy Journal* 16, 446-456.
- Ostadraximi, A., Taghizadeh, A., Mobasser, M., Farrin, N., Payahoo, L., Gheshlaghi, Z.B., Vahedjabbari, M. 2015. Effect of Probiotic Fermented Milk (Kefir) on Glycemic Control and Lipid Profile in Type 2 Diabetic Patients: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Clinical Trial. *Iranian Journal of Public Health.* 44:228-237.
- Palmer, C., Bik, E.M., DiGiulio, D.B., Relman, D.A., Brown, P.O. 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biology.* 5:1556-1571.

- Pan, Xiaodong, Chen, F., Wu, T., Tang, H., Zhao, Z. 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Food Control*. 20:598-602.
- Park, H.K., Shim, S.S., Kim, S.Y., Park, J.H., Park, S.E., Kim, H.J., Kang, B.C., Kim, C.M. 2005. Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *Journal of Microbiology*. 43:345-353.
- Park, J.H., Lee, S.Y. 2010. Fermentative production of branched chain amino acids: a focus on metabolic engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85:491–506.
- Penner, R., Fedorak, R.N., Madsen, K.L. 2005. Probiotics and nutraceuticals: non-medical treatments of gastrointestinal diseases. *Current Opinion of Pharmacology*. 5:596-603.
- Pescuma, M., Hébert, E.M., Mozzi, F., Font de Valdez, G., 2007. Hydrolysis of whey proteins by *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* grown in a chemically defined medium. *Journal of Applied Microbiology* 103, 1738-1743.
- Pinzón, C.E., Serrano, M.L., Sanabria, M.C. 2009. Papel de la vía fosfatilinositol 3 kinasa (PI3K/Akt) en humanos. *Rev. Cienc. Salud. Bogota.* 7:47-66.
- Quin, J., Li, R., Raes, J., Arumagan, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., Yamada, T. Mende, D.R., Li, J., Xu, J., Li, S., Li, D., Cao, J., Wang, B., Liang, H., Zheng, H., Xie, Y., Tap, J., Lepage, P., Bertalan, M., Batto, J.M., Hansen, T., Le Paslier, D., Linneberg, A., Nielsen, H.B., Pelletier, E., Renault, P., Sicheritz-Ponten, T., Turner, K., Zhu, H., Yu, C., Li, S., Jian, M., Zhou, Y., Li, Y., Zhang, X., Li, S., Qin, N., Yang, H., Wang, J., Brunak, S., Dore, J., Guarner, F., Kristiansen, K., Pedersen, O., Parkhill, J., Weissenbach, J., Bork, P., Ehrlich, S.E., Wang, J. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomics sequencing. *Nature*. 464:59-65.
- Rajilic-Stojanovic, Smidt H. y De Vos W.M. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ. Microbiol.* 9: 2125-2136.
- Ratnayake-Lecamwasam, M., P. Serror, K. W. Wong, and A. L. Sonenshein. 2001. *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* 15:1093–1103.
- Reeds, P.J. 2000. Dispensable and Indispensable amino acids for humans. *The Journal of Nutrition*. 130:1835S—1840S.
- Reitzer, L.J, Magasanik, B. 1982. Asparagine synthetases of *Klebsiella aerogenes*: properties and regulation of synthesis. *Journal of Bacteriology*. 151:1299-1313.
- Reitzer L.J. 2003. Nitrogen assimilation and global regulation in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*. 57:155-176.
- Routary W, Mishara (2011) Scientific and Technical Aspects of Yogurt Aroma and Taste: A Review. *IFT* 10:208-220.
- Sahadera, R.P.K., Leong, S.F., Chua, K.H., Tan, C.H., Chan, H.Y., Tong, E.V., Wong, S.Y.W., Chan H.K. 2011. Survival of commercial probiotics strains to pH and bile. *International Food Research Journal*. 18:1515-1522.

- Saito, H., Kasajima, T., Masuda, A., Imai, Y., Ishikawa, M. 1988. Lysozyme localization in human gastric and duodenal epithelium. An immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 25:307:313.
- Sánchez, B., Champomier-Vergès, M.C., Collado, M.C., Anglade, P., Baraige, F., Sanz, Y., de los Reyes-Gavilán, C.G. 2007. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype *longum*. 73:6450-6459.
- Sasaki, M., Bosman, B.W., Tan, P.S. 1995. Comparison of proteolytic activities in various lactobacilli. *Journal of Dairy Research* 62, 601-610.
- Savijovi, K., Ingmer, H., Varmanen, P., 2006. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology* 71, 394-406.
- Settachaimongkon S, Nout R, Fernandes E C A, Hettinga K A, Hervoort J M, Hooijdonk T C M, Zwietering M H, Smid E J, Valenberg H J F. 2014. Influence do different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal Food Microbiology* 177, 29-36.
- Siragusa, S., De Angelis, M., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2014. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of Proteomics* 96, 366-380.
- Rawlings, N.D: Waller, M., Barret, A.J., Bateman, A. 2014. MEROPS: The database of proteolytic enzymes their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* 42, D503-D509.
- Roesch, P.L., Redford, P., Batcheler, S., Moritz, R.L., Pellet, S., Haugen, B.J., Blattner, F.R., Welch, R.A. 2003. Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Molecular Microbiology* 49:5-67.
- Salmínen S, Von W.A. y Ouwehand A. *Lactic Acid Bacteria: Microbiol and Functinal Aspects.* Marcel Dekker, Inc. New York. 2004.
- Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y., Gorbach, S.L. 1998. Lactic acid bacteria in health and disease. In: Salminen S, Von Wright A, eds. *Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects*, 2nd ed. New York: Marcel Dekker Inc. 211–53.
- Santos, J.A., López-Díaz, T.M., García-Fernández, M.C., García-López, M.L., Otero, A. 1996. Characterization and extracellular activity of psychrotrophic bacteria isolated from Villalón cheese (fresh variety of Spanish sheep's milk cheese). *International Journal of Food Microbiology.* 33(301-3016).
- Sanz, Y., Lanfermeijer, F.C., Renault, P., Bolotin, A., Konings, W.N., Poolman, B., 2001. Genetic and functional characterization of *dpp* genes encoding dipeptide transporter system in *Lactococcus lactis*. *Archive of Microbiology.* 175:334-343.
- Satoshi O, Shinya F, Shintaro I; HOFFMANN EITE. METHOD FOR PRODUCTION OF L-AMINO ACID. Ajinomoto Co., Inc. European patent application. EP 2080808 A1. 22.07.2009.
- Savadogo A, Ouattara CAT, Savadogo PW, Ouattara AS, Barro N Traore AS (2004) Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition* 3 (2):134-139.

Savijoki, K., Ingmer, H., Varmanen, P. 2006. Proteolytic system of lactic acid bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71:394-406.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pressi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D., Arigoni, F. 2002. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation of the human gastrointestinal tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99: 14422–14427.

Segata, N., Haake, S.K., Mannon, P., Lemon, K.P., Waldron, L., Gevers, D., Huttenhower, C., Izard, J. 2012. Composition of the adult digestive tract bacterial microbiome based on seven mouth surfaces, tonsils, throat and stool samples. *Genome Biology*. 13R42:1-18.

Sepp, E., Naaber, P., Voor, T., Mikelsaar, M., Björkstén. 2000. Development of intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 22-26.

Settachaimongkon S, Nout R, Fernandes E C A, Hettinga K A, Hervoort J M, Hooijdonk T C M, Zwietering M H, Smid E J, Valenberg H J F. 2014. Influence of different proteolytic strains of *Streptococcus thermophilus* in co-culture with *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* on the metabolite profile of set-yoghurt. *International Journal Food Microbiology* 177, 29-36.

Shahjee, H.M., Banerjee, K., Ahmad, F. 2002. Comparative analysis of naturally occurring L-amino acid osmolytes and their D-isomers of protection of *Escherichia coli* against environmental stresses. *Journal of Biosciences*. 27:515-520.

Singh, B.K., Shaner, D.L. 1995. Biosynthesis of branched chain amino acids: from test tube to field. *The plant cell*. 7:935-944.

Siragusa, S., De Angelis, M., Calasso, M., Campanella, D., Minervini, F., Di Cagno, R., Gobbetti, M., 2014. Fermentation and proteome profiles of *Lactobacillus plantarum* strains during growth under food-like conditions. *Journal of Proteomics* 96, 366-380.

Snijders, J.M., van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A.A., Smulders, F.J.M. 1985. Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures. *Veterinary Quarterly* 7: 277–282.

Sullivan, A., Törnblom, H., Lindberg, G., Hammarlund, B., Palmgren, A-C., Einarson, C., Nord, C.E. 2003. The micro-flora of the small bowel in health and disease. *Anaerobe*. 9:11-14.

Sun, A., Harris, H.M.B., McCann, A., Guo, C., Argimó, S., Zhang, W., Yang, X., Jeffery, I.B., Cooney, C., Kagawa, T.F., Liu, W., Song, Y., Salvetti, E., Wrobel, A., Rasinkangas, P., Parkhill, J., Rea, M.C., O’Sullivan, O., Ritari, J., Douillard, F.P., Ross, R.P., Yang, R., Briner, A.E., Willen, E.F., de Vos, W.M., Barrangou, R., Klaenhammer, T.R., Caufield, P.W., Cui, Y., Zhang, H., O’Toole, P.W. 2015. Expanding the biotechnology potential of lactobacilli through comparative genomics of 213 strains and associated genera. *Nature Communications*. DOI: 10.1038/ncomms9322.

Tomé, D. 2013. Digestibility issues of vegetables versus animal proteins: protein and amino acids requirements-functional aspects. *Food and Nutrition Bulletin*. 34:272-274.

Tondo EE, Lakus FR, Oliveira FA, Brandelli A (2004) Identification of heat stable protease of *Klebsiella oxytoca* isolated from raw milk. *Letters in Applied Microbiology* 38:146-150.

- Tong, X., Li, W., Xu, J.Y., Han, S., Qin, L.Q. 2014. Effects of whey protein and leucine supplementation on insulin resistance in non-obese insulin-resistant model rats. *Nutrition*. 30:1076-1080.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., Yatsunencko, T., Cantarel, B., Duncan, A., Ley, R.E., Sogin, M.L., Jones, W.J., Roe, B.A., Affourtit, J.P., Egholm, M., Henrissat, B., Heath, A.C., Knight, R., Gordon, J.I. 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 457:480-485.
- Valle, J., Da Re, S., Schmind, S., Skurnik, D., D'Ari, R., Ghigo, Jean-Marc. 2008. The amino acid valine is secreted in continuous-flow bacterial biofilms. *Journal of Bacteriology*. 190:264-274.
- Vinderola, G., Capellini, B., Villarreal, F., Suárez, V., Quiberoni, A., Reinheimer, J., 2008. Usefulness of a set of simple *in vitro* tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. *LWT - Food Science and Technology* 41, 1678-1688.
- Webb, M. 1958. Aminopterin inhibition in *Aerobacter aerogenes*: alanine and valine accumulation during the inhibition and their utilization on recovery. *Biochemistry Journal*. 70:472-486.
- Webb, M. 1968. Pyruvate accumulation in growth-inhibited cultures of *Aerobacter aerogenes*. *Biochemistry Journal*. 106:375-380.
- Wray, J., Ferson, A.E., Rohrer, K., Fisher, S.H. 1996. TnrA, a transcription factor required for global nitrogen regulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 93: 8841-8845.
- Wray, L.V., Zalieckas, J.M., Fisher, S.H. 2001. *Bacillus subtilis* glutamine synthetase controls gene expression through a protein-protein interaction with transcription factor TnrA. *Cell* 107:427-435.
- Woodmansey, E.J., Intestinal bacteria and ageing. 2007. *J Appl Microbiol*. 102:1178-1186.
- Yakub Pasha S, Naiman Ali M, Tabassum H, Khan Mohd M. 2011. Comparative studies on production of glutamic acid using wild type, mutants, immobilized cells and immobilized mutants of *Corynebacterium glutamicum*. *International J Eng and Technol*. 3:3941-3949.
- Yeboah, N., Ah-Sing, E., Badaloo, L., Forrester, T.A., Jackson, A., Millward, D.J. 1996. Transfer of ¹⁵N from urea to the circulating lysine pool in the human infant. *Proc. Nutr. Soc.* 55:37.
- Yilmaz, L. and Kurdal, 2014. The production of Set-Type-Bio-Yoghurt with Commercial Probiotic Culture. *International Journal of Chemical Engineering and Applied* 5, 402-408.
- Yüksel, A.K., Bakırcı, I. 2015. An Investigation of the Volatile Compound Profiles of Probiotic Yogurts Produced Using Different Inulin and Demineralised Whey Powder Combinations. *Food Sci. Biotechnol* 24(3):807-816.
- Zago, M., Fornasari, M.E., Carminati, D., Burns, P., Suárez, V., Vinderola, G., Reinheimer, J., Giraffa, G. 2011. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol*. 28:1033-40.
- Zereian M, Ebrahimpour A, Abu Bakar F, Karim A, Mohamed S, Forghani B, Safuan M and Saari N. 2012. A Glutamic Acid-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Malaysian Fermented Foods. *Int. J. Mol. Sci*. 13:5482-5497.

Zinedine, A., Faid, M. 2007. Isolation and characterization of strains of Bifidobacteria with probiotic properties In vitro. World Journal of Dairy & Food Sciences. 2:28-34.

Páginas de internet

<http://www.fao.org/ag/humannutrition/nutrition/63158/en/>

<http://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-pi3k-akt-signaling-resources/mtor-signaling-pathway/pathways-mtor-signaling>

<http://www.cellsignal.com/contents/science-pathway-research-pi3k-akt-signaling-resources/pi3k-akt-signaling-pathway/pathways-akt-signaling>

APENDICE A

Composición química de los medios de cultivos empleados y de las soluciones.

Caldo De Man Rogosa and Sharpe (MRS)

| Componente | g/L |
|------------------------|------|
| Proteosa peptona No. 3 | 10 |
| Extracto de levadura | 8.0 |
| Extracto carne | 4.0 |
| Glucosa | 20 |
| Tween 80 | 1.0 |
| Fosfato dipotásico | 2.0 |
| Acetato de sodio | 5.0 |
| Citrato de amonio | 2.0 |
| Sulfato de magnesio | 0.2 |
| Sulfato de manganeso | 0.05 |

pH final 6.4 ±0.2

Consideraciones:

- Para la elaboración de medio sólido MRS se adicionaron 15 g de Agar bacteriológico.
- En medio modificado MRS se reemplazó la peptona proteosa No. 3 por peptona de caseína.
- Para mantener las condiciones de anarobiosis en el medio de aislamiento se adicionó como agente reductor Tioglicolato de sodio en 0.5g /L.

Solucion de fosfatos

| Componente | g/L |
|-------------------------------|------|
| Cloruro de sodio | 8.06 |
| Cloruro de potasio | 0.22 |
| Fosfato dibásico de potasio | 1.15 |
| Fosfato monobásico de potasio | 2.0 |

pH final ajustado con NaOH 1N o HCl 1N

Consideraciones:

- Para la dilución de las muestras fecales se ajusto a H=7.0.
- Para las prueba de tolerancia a pH y crecimiento a diferentes pH se ajusto con HCl 1N.
- Para las pruebas de bilis se ajusto con HCl 1N.

Medio mineral

| Componente | Masa / L |
|-------------------------------|----------|
| Sulfato de amonio | 5 g |
| Ácido bórico | 500 µg |
| Cloruro de calcio | 0.1g |
| Sulfato de cobre | 40 µg |
| Cloruro férrico | 200 µg |
| Sulfato de magnesio | 0.5 g |
| Sulfato de manganeso | 400 µg |
| Yoduro de potasio | 100 µg |
| Fosfato monobásico de potasio | 1.0 g |
| Cloruro de sodio | 0.1 g |
| Molibdato de sodio | 200 µg |
| Sulfato de zinc | 400 µg |
| Glucosa | 20 g |
| Ácido p-aminobenzoico | 100 µg |
| Biotina | 2 µg |
| Pantotenato de calcio | 400 µg |
| Ácido fólico | 2 µg |
| Inositol | 2 µg |
| Niacina | 400 µg |
| Piridoxina | 400 µg |
| Riboflavina | 200 µg |
| Tiamina | 400 µg |

pH ajustado a 7.0

Consideraciones:

- El medio se esterilizó por filtración utilizando una membrana millipore de 0.25 µm.

APENDICE B

Patrón de utilización de sustratos de los aislados seleccionados para la identificación bioquímica mediante el sistema Biolog.

| No. | Sustrate | Isolates | | | | |
|-----|---------------------------------|----------|-----|-----|-----|-----|
| | | 11J | 34J | 43J | 35F | 35H |
| 1 | water | - | - | - | - | - |
| 2 | α -cyclodextrin | - | - | - | - | - |
| 3 | Dextrin | + | + | + | + | + |
| 4 | Glycogen | - | - | - | + | + |
| 5 | Tween 40 | - | - | - | + | + |
| 6 | Tween 80 | - | - | - | + | + |
| 7 | N-Acetyl-D-galactosamine | + | + | + | - | - |
| 8 | N-Acetyl-D-glucamine | + | + | + | + | + |
| 9 | Adonitol | - | - | - | + | - |
| 10 | L-arabinose | + | + | + | + | + |
| 11 | D-Arabitol | - | - | - | + | + |
| 12 | D-Cellobiose | - | - | - | + | + |
| 13 | i-Erythritol | - | - | - | - | + |
| 14 | D-Fructose | + | + | + | + | + |
| 15 | L-Fucose | + | + | + | + | + |
| 16 | D-galactose | + | + | + | + | + |
| 17 | Gentiobiose | - | - | - | + | + |
| 18 | α -D-Glucose | + | + | + | + | + |
| 19 | m-Inositol | - | - | - | + | + |
| 20 | Lactose | + | + | + | + | + |
| 21 | Lactulose | + | + | + | + | + |
| 22 | Maltose | + | + | + | + | + |
| 23 | D-Mannitol | + | + | + | + | + |
| 24 | D-Mannose | + | + | + | + | + |
| 25 | D-Melibiose | + | + | + | + | + |
| 26 | β -Methyl-D-Glucoside | + | + | + | + | + |
| 27 | D-Psicose | - | - | - | + | + |
| 28 | D-Raffinose | - | - | - | + | + |
| 29 | L-Rhamnose | + | + | + | + | + |
| 30 | D-Sorbitol | + | + | + | + | + |
| 31 | Sucrose | + | + | + | + | + |
| 32 | D-Threalose | + | + | + | + | + |
| 33 | Turanose | - | - | - | + | + |
| 34 | Xylitol | - | - | - | - | + |
| 35 | Pyruvic Acid Methyl-Ester | + | + | + | + | + |
| 36 | Succinic Acid mono-Methyl-Ester | - | - | - | + | + |
| 37 | Acetic Acid | - | - | - | + | - |
| 38 | Cis-Aconitic Acid | - | - | - | + | + |
| 39 | Citric Acid | - | - | - | + | + |
| 40 | Formic Acid | + | + | + | - | - |
| 41 | D-Galactonic Acid Lactone | + | + | + | + | + |
| 42 | D-Galacturonic Acid | + | + | + | + | + |
| 43 | D-Gluconic Acid | + | + | + | + | + |
| 44 | D-Glucosaminic Acid | - | - | - | + | + |
| 45 | D-Glucuronic Acid | + | + | + | + | + |
| 46 | α -Hydroxybutyric Acid | - | - | - | - | - |
| 47 | β -Hydroxybutyric Acid | - | - | - | - | + |
| 48 | γ -Hydroxybutyric Acid | - | - | - | - | - |
| 49 | p-Hydroxy-Phenylacetic Acid | - | - | - | + | + |
| 50 | Itaconic Acid | - | - | - | - | - |
| 51 | α -Keto Butyric Acid | - | - | - | - | - |
| 52 | α -Keto Glutaric Acid | - | - | - | - | - |

| | | | | | | |
|----|-----------------------------------|---|---|---|---|---|
| 53 | α -Keto Valeric Acid | - | - | - | - | - |
| 54 | D,L-Lactic Acid | + | + | + | + | + |
| 55 | Malonic Acid | - | - | - | + | + |
| 56 | Propionic Acid | - | - | - | - | - |
| 57 | Quinic Acid | - | - | - | + | + |
| 58 | D-Saccharic Acid | - | - | - | + | + |
| 59 | Sebacic Acid | - | - | - | - | - |
| 60 | Succinic Acid | + | + | + | + | + |
| 61 | Bromosuccinic Acid | + | + | + | + | + |
| 62 | Succinamic Acid | - | - | - | - | + |
| 63 | Glucuronamide | + | + | + | + | + |
| 64 | L-Alaninamide | - | - | - | - | + |
| 65 | D-Alanine | + | + | + | + | + |
| 66 | L-Alanine | + | + | + | + | + |
| 67 | L-Alanyl-glycine | + | + | + | + | + |
| 68 | L-Asparagine | + | + | + | + | + |
| 69 | L-Aspartic Acid | + | + | + | + | + |
| 70 | L-Glutamic Acid | - | - | - | - | + |
| 71 | Glycyl-L-Aspartic Acid | + | + | + | + | + |
| 72 | Glycyl-L-Glutamic Acid | - | - | - | - | - |
| 73 | L-Histidine | - | - | - | + | + |
| 74 | Hydroxy-L-Proline | - | - | - | - | + |
| 75 | L-Leucine | - | - | - | - | - |
| 76 | L-Ornithine | - | - | - | - | - |
| 77 | L-Phenylalanine | - | - | - | - | - |
| 78 | L-Proline | - | - | - | - | - |
| 79 | L-Pyroglutamic Acid | - | - | - | - | - |
| 80 | D-Serine | - | + | + | + | + |
| 81 | L-Serine | + | + | + | + | + |
| 82 | L-Threonine | - | - | - | - | - |
| 83 | D,L-Carnitine | - | - | - | - | - |
| 84 | γ -Amino Butyric Acid | - | - | - | - | + |
| 85 | Urocanic Acid | - | - | - | - | - |
| 86 | Inosine | + | + | + | + | + |
| 87 | Uridine | + | + | + | + | + |
| 88 | Thymidine | + | + | + | + | + |
| 89 | Phenylethyl-amine | - | - | - | - | - |
| 90 | Putrescine | - | - | - | + | + |
| 91 | 2-Aminoethanol | - | - | - | - | - |
| 92 | 2,3-Butanediol | - | - | - | - | - |
| 93 | Glycerol | + | + | + | + | + |
| 94 | D,L- α -Glycerol Phosphate | + | + | + | + | + |
| 95 | α -D-Glucose-1-Phosphate | + | + | + | + | + |
| 96 | α -D-Glucose-6-Phosphate | + | + | + | + | + |

APENDICE C

Secuencias de aislados de la amplificación del gen completo de gen ribosomal 16S rARN de los aislados seleccionados productores de aminoácidos ramificados.

Aislado 11J (Número de acceso a GenBank: KY229764)

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCT
TTGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACTA
CTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT
GCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGAT
CCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGGCGCGTGTATG
AAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGACTTTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTT
TACTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA
GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAG
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT
CCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGA
ATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAGCGCGAAGAACCTT
ACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTTGAAATGTTGGGTTAAGTTCGGCA

Aislado 34J (Número de acceso a GenBank: KY229765)

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCT
TCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACT
ACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTT
TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTT
TGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCA
GATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAG
AGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCG
AAGGCGGCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTT
CCGGAGCTAACCGGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
TGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTAC
CTGGTCTTGACATCCACAGAAGTTTCCAAAGATGGATTGTTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGT
GCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCATGTTGTGAATGATGGTAAGTTCCGCACAGCGCAACCTATCTT
TGTGTCTACCGTTCAGCCGGAAGTCAAGAGAAGTCCAGTGTAACTTGA

Aislado 43J (Número de acceso a GenBank: KY229766)

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCT
TCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACT
ACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
TGCCATCGGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGTCGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTAGG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTAT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGACTTTTTTCAGCGGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCT
TTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATA
CGGAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTC
AGATGTGCAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATCAGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTA
GAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGC
GAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATT
AGATAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGC
TTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATG
AATTGACGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCT
TACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGAA
CAGGTGCTGCATGACTGTCGTGACTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC
AAACCCGTTATCCTTTGTTGCCAGCCGGGTCGGGCCGGGA

Aislado 35F (Número de acceso a GenBank: KY229767)

TAATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCT
CGGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAACT
ACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCA
TGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAATGGCTCACCTAGGCGACGA
TCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGT
GAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGGGGAGGAGGGCGGTGAGGTTAATAACCTC
ATCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
GAGGGTGAAGCGTTAATCGGAATTAAGTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTCTGTCAAGTCGG
ATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGA
GGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGA
AGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCC
GGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAGCTCAATGAATTG
ACGGGGGCCCGCACAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAGAGCTTACCTGGT
CTTGACATCCACAGAACCCTTCAAATGGATTGGTGCCTCCTGGAAGTGTGAGACAAGTGTG
CTTGGCTGTCGTTACAGCTCATGTTGTGAATGTTGGGTAGTTCCCCACAGGCGCAACCTTATCCT
TTGTTTCTATCGGTCCGGCGGGGAACTCAAAGAAAATGCA

Aislado 35H (Número de acceso a GenBank: KY229768)

ATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTCG
GGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAATTAC
TGGAACCGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGTGGGGGACCTTCGGGCCTCATG
CCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATC
CCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGA
AGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAGGAAGGCGGTGAGGTTAATAACCTCAT
CGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGA
GGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGGAT
GTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGG
GGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAG
GCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGTTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCG
GAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACTCAAATGAATTG
ACGGGGGCCCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCT
GGTCTTGACATCCACAGAACTTTCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTGTGAGACAAGGTG
CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCTGTTTGTGAATGGTTGGGATAAGTTCCCGCACCAAGGCAACCTT
ATCCTTTGTTGCTGCGTTAGGCGGGGGACTCAAAGAAAAATGCCAG

CURRICULUM VITAE

DATOS GENERALES

NOMBRE HUGO ROSALES BRAVO
CORREO ELECTRONICO rbhugo@hotmail.com

ESCOLARIDAD INGENIERO EN ALIMENTOS, MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS, MAESTRIA EN NUTRICIÓN CLÍNICA Y DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS.

FORMACIÓN PROFESIONAL

POSGRADO **DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N (CINVESTAV Unidad Irapuato)
SEPTIEMBRE DE 2011 A FEBRERO DE 2017

MAESTRIA EN NUTRICIÓN CLÍNICA
UNIVERSIDAD DEL VALLE DE ATEMAJAC (UNIVA)
SEPTIEMBRE DEL 2009 A DICIEMBRE DE 2011

MAESTRIA EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS DEL I.P.N (CINVESTAV Unidad Irapuato)
SEPTIEMBRE DE 2005 A FEBRERO 2008

PROFESIONAL **INGENIERIA EN ALIMENTOS**
UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO
IRAPUATO, GUANAJUATO
AGOSTO DE 1998 A AGOSTO 2003

EXPERIENCIA LABORAL

EMPRESA INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE GUANAJUATO
GIRO EDUCATIVO
FECHO DE INGRESO JULIO 2016
PUESTO PROFESOR

FUNCIONES Profesor de las asignaturas de Microbiología de Alimentos, Introducción a Industrias Alimentarias, Taller de Investigación.

EMPRESA **UNIVERSIDAD DEL VALLE DE ATEMAJAC CAMPUS LA PIEDAD**
GUADALUPANA 1000
COL. TECNOLÓGICO
LA PIEDAD, MICHOACÁN.

GIRO EDUCATIVO

FECHA DE INGRESO ENERO DE 2016 A LA FECHA

PUESTO PROFESOR DE ASIGNATURA

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES Profesor por asignatura en la Lic. en Nutrición, impartiendo las materias: Metodología de la investigación, Microbiología Sanitaria, Tecnología y Bromatología de los alimentos, Terapia antioxidante y Biología celular, molecular y metabólica aplicada a situaciones patológicas y nutricionales.

EMPRESA **UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO**
DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA CAMPUS IRAPUATO-SALAMANCA
CARRETERA IRAPUATO-LEON
IRAPUATO, GUANAJUATO.

GIRO EDUCATIVO

FECHA DE INGRESO ENERO DE 2012 A LA FECHA

PUESTO PROFESOR DE ASIGNATURA

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES Profesor de la materia de Química General en curso propedéutico; Química 1 en Ing. en Alimentos; Procesamiento de Alimentos I y II en Lic. en Agronegocios; Nutrición en Ing. en Alimentos; Nutrición y Microbiología y Parasitología en Lic. en Enfermería modalidad a distancia.

EMPRESA **UNIVERSIDAD DEL VALLE DE ATEMAJAC CAMPUS TEPIC**
SIERRA DE SAN JUAN No. 29
COL. JARDINES DE LA CRUZ
TEPIC, NAYARIT.

GIRO EDUCATIVO

FECHA DE INGRESO ENERO DE 2009 A NOVIEMBRE DE 2011, OCTUBRE 2011 Y JUNIO 2012, FEBRERO DE 2013, FEBRERO Y SEPTIEMBRE DE 2014, FEBRERO-MARZO 2015, SEPTIEMBRE-OCTUBRE 2015, ABRIL 2016, OCTUBRE 2016 y ENERO 2017.

PUESTO **PROFESOR DE ASIGNATURA**

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES Profesor en la Licenciatura en nutrición de las materias: Microbiología y Parasitología, Microbiología Sanitaria, Metodología de la Investigación, Proyectos de Investigación en Ciencias de la Salud y Seminario de Tesis.

Profesor de Maestría en Nutrición Clínica en la materia de Bioquímica Clínica, Bases metabólicas del metabolismo y Nutrición molecular.

EMPRESA **UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUADALAJARA CAMPUS TEPIC**
AV. INDEPENDENCIA No. 245 Sur
FRACC. SIMANCA
TEPIC, NAYARIT.

GIRO EDUCATIVO

FECHA DE INGRESO FEBRERO DE 2009 AL 15 DE AGOSTO DE 2011

PUESTO **PROFESOR DE ASIGNATURA**

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES Profesor de nivel medio superior en las materias: Genética, Biología, Química y Ecología y medio ambiente.

Profesor de la Licenciatura en Nutrición en las materias: Biología celular y molecular; Genética en nutrición.

EMPRESA **PREPARATORIA JOHN F. KENNEDY**
ACAPONETA No. 34
FRACC. FRAY JUNIPERO SERRA
TEPIC, NAYARIT

GIRO EDUCATIVO

FECHA DE INGRESO AGOSTO DE 2008 A DICIEMBRE DE 2008

PUESTO **PROFESOR DE ASIGNATURA Y TUTOR ACADÉMICO**

FUNCIONES Y RESPONSABILIDADES Profesor de las materias: Química general, Biología, Ecología y medio ambiente, Ética y valores.

Tutor académico: Tutorías individuales.

CURSOS IMPARTIDOS

CURSO TALLER **MICROBIOLOGÍA GENERAL**

EMPRESA UNIVERSIDAD DEL VALLE DE ATEMAJAC CAMPUS TEPIC

AÑO 2011

TALLER **IMPORTANCIA DE LOS HÁBITOS ALIMENTICIOS EN LA SALUD HUMANA**

EMPRESA TOPURA FASTENER DE MEXICO

AÑO 2016

TALLER

NUTRICIÓN PRÁCTICA PARA TODOS

EMPRESA

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE GUANAJUATO

AÑO

2016

**DIPLOMADOS Y
CONFERENCIAS IMPARTIDAS**

CONFERENCIA

“IMPORTANCIA DEL CICLO DEL NITRÓGENO EN EL ECOSISTEMA TERRESTRE”

INSTITUCIÓN

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE SALAMANCA (28 DE OCTUBRE DE 2011)

CONFERENCIA

“IMPORTANCIA DE LOS PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN”

INSTITUCIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE IRAPUATO CAMPUS ABASOLO (SEPTIEMBRE DE 2012).

CONFERENCIA

“APLICACIONES DE LOS PROBIÓTICOS EN LA NUTRICIÓN”

INSTITUCIÓN

INSTITUTO TECNOLÓGICO SUPERIOR DE GUANAJUATO (SEP, 2012).

CONFERENCIA

“USO DE ALIMENTOS FUNCIONALES EN EL PACIENTE ONCOLÓGICO Y RENAL”

INSTITUCIÓN

ASOCIACIÓN MEXICANA DE ASPERGER Y AUTISMO A.C. (DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN) MARZO 2015.

CONFERENCIA

“LOS PROBIÓTICOS EN NUTRICIÓN CLÍNICA”

INSTITUCIÓN

UNIVERSIDAD DE LAS AMERICAS DE NAYARIT PRIMER CONGRESO NACIONAL EN NUTRICIÓN (ENERO 2016).

CONFERENCIA

“APLICACIÓN DE PROBIÓTICOS EN ENFERMEDADES CRÓNICO DEGENERATIVAS”

INSTITUCIÓN

COLEGIO DE NUTRIÓLOGOS DEL ESTADO DE NAYARIT (ENERO 2016).

CURSOS TOMADOS

DIPLOMADO

PEDAGOGÍA INTERACTIVA

EMPRESA

UNIVERSIDAD DEL VALLE DE ATEMAJAC CAMPUS TEPIC

AÑO

2010

DIPLOMADO**NUTRICIÓN ORTOMOLECULAR****EMPRESA**

INSTITUTO DE POSGRADOS Y CIENCIAS (GUADALAJARA, JALISCO).

AÑO

2014

CONGRESOS Y PUBLICACIONES

CONGRESO**CONGRESO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA INORGÁNICA****PARTICIPACIÓN**

"Determinación de vitamina C en 2 variedades de fresa de la región de Irapuato por método volumétrico e instrumental (espectrofotométrico)".

FECHA

2001

PUBLICACIÓNNovel consortium of *Klebsiella variicola* and *Lactobacillus* species enhances the functional potential of fermented dairy products by increasing amino acids bioavailability and diversity and amount of volatiles.**REVISTA****CURRENT MICROBIOLOGY****FECHA**

2017

INVESTIGACIÓN

TESIS DOCTORADO

"AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS A PARTIR DE HECES DE INFANTES LACTANTES CON CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS RAMIFICADOS Y POTENCIAL PROBIÓTICO"

TESIS MAESTRÍA"AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS A PARTIR DE UNA FERMENTACIÓN NATURAL DE MOSTO DE *Agave tequilana* WEBER VAR. AZUL"**TESIS LICENCIATURA**

"CONGELACIÓN DE FRESA POR MÉTODO MIXTO (CRIOGÉNICO Y MECÁNICO)"

TESIS DIRIGIDAS

TÍTULO "CAPACIDAD DE PRODUCCIÓN DE AMINOÁCIDOS ESENCIALES POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS"

GRADO LICENCIATURA

INSTITUCIÓN UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DEL BICENTENARIO-CINVESTAV IRAPUATO.

TÍTULO "AISLAMIENTO, SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LEVADURAS A PARTIR DE UNA FERMENTACIÓN NATURAL DE COLONCHE, BEBIDA ALCOHÓLICA A BASE DE *Opuntia Streptacantha*.

GRADO LICENCIATURA

INSTITUCIÓN DIVISIÓN CIENCIAS DE LA VIDA, UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO-CINVESTAV IRAPUATO.

DECLARACIÓN DE INDEPENDENCIA

Por este medio declaro que yo he preparado este trabajo de tesis de forma independiente y sin ayuda externa. Especialmente declaro que he citado de forma correcta y explícita a los autores y trabajos en los que esta tesis se apoya, así como a las contribuciones de las personas que coadyuvaron en su desarrollo.

Irapuato, Guanajuato, México
Febrero de 2017

Hugo Rosales Bravo
Estudiante de Doctorado