



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOTECNOLOGÍA

*“Formación de biopelículas de bacterias ácido-lácticas
aisladas de agave para la producción de ácido láctico”*

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

M.C. NAYELI AIME MARTHA LUCERO

MATRICULA: 2203802315

OCIRD: 0009-0003-6229-8690

CORREO: martha.nayeliaime@gmail.com

DIRECTORA

DRA. ALMA ELIZABETH CRUZ GUERRERO

ASESORES:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ

DR. LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ OLIVARES

JURADO:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZÁLEZ (Presidente)

DR. LUIS GUILLERMO GONZÁLEZ OLIVARES (Secretario)

DRA. MÓNICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS (Vocal)

DR. ERIC ORTEGA SÁNCHEZ (Vocal)

Iztapalapa, CDMX

a

10 de diciembre del 2024

Contenido

Abreviaturas	10
Resumen	11
1. Introducción	13
2. Marco teórico.....	16
2.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL).....	16
2.1.1 Requerimientos nutricionales	16
2.1.2 Fuente de carbono.....	16
2.1.3 Fuente de nitrógeno.....	18
2.1.4 Vitaminas y Minerales.....	19
2.2 Tipos de fermentación láctica.....	19
2.3 Ácido láctico (AcL)	20
2.4 Exopolisacáridos producidos por las BAL	21
2.4.1 Tipos de EPS.....	22
2.4.1.1 Homopolisacáridos (HoPS)	22
2.4.1.2 Heteropolisacáridos (HePS)	23
2.5 Biopelículas.....	25
2.6 Soportes para la formación de biopelículas	27
2.7 Producción de AcL con biopelículas.....	28
2.8 Importancia del agave	30
2.9 Distribución de las plantas de agave	32
2.10 <i>Agave salmiana</i>	33
2.11 Subproductos del agave	34
2.12 Fructanos de agave	37
2.13 Saponinas en los agaves	37
3. Hipótesis	39
4. Justificación	39
5. Planteamiento del problema.....	40
6. Objetivo.....	40
6.1 Objetivo general	40
6.2 Objetivos particulares	41
7. Plan de trabajo.....	42
8. Materiales y métodos	44
8.1 Microorganismos	44

8.2 Medio de cultivo	44
8.3 Fuente de carbono	45
8.4 Determinación de crecimiento	45
8.5 Determinación de pH	45
8.6 Determinación de carbohidratos totales	45
8.7 Actividad enzimática con fructosidasas.....	46
8.8 Determinación de EPS	47
8.9 Auto agregación.....	48
8.10 Hidrofobicidad.....	48
8.11 Formación de biopelícula en microplaca	49
8.12 Parámetros evaluados en la formación de biopelículas.....	50
8.13 Formación de biopelículas en perlas de polipropileno	51
8.14 Microscopía electrónica de barrido (SEM)	52
8.15 Determinación de AcL	52
8.16 Preparación del jugo de agave.....	52
8.17 Eliminación de saponinas en el jugo de la hoja de agave.....	53
8.18 Determinación de distribución de carbohidratos por HPLC-SEC.....	53
8.19 Determinación de glucosa.....	53
8.20 Determinación de fructosa, sacarosa y fructanos GP = 22.7	54
8.21 Fermentaciones en jugo de agave	54
8.22 Determinación de proteínas del jugo de la hoja de agave	54
8.23 Extracción de saponinas del jugo de la hoja de agave	55
8.24 Cuantificación de saponinas.....	55
8.25 Determinación cualitativa de saponinas	55
8.26 Análisis estadístico.....	56
9. Resultados y discusión	56
9.1 Crecimiento microbiano con distintas fuentes de carbono	56
9.2 Determinación de pH	58
9.3 Crecimiento específico	60
9.4 Actividad enzimática con fructanos de agave	62
9.5 Producción de EPS	63
9.6 Auto agregación.....	65
9.7 Hidrofobicidad.....	66
9.8 Formación de biopelículas con distintas fuentes de carbono	68
9.9 Formación de biopelículas con distintos valores de pH	70



9.10 Formación de biopelículas con distintas concentraciones de fructanos	72
9.11 Formación de biopelículas con distintos tiempos de fermentación.....	74
9.12 Formación de biopelículas con distintas fuentes de nitrógeno.....	76
9.13 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)	79
9.14 Producción de AcL con biopelículas	80
9.15 Evaluación de jugo de agave para formación de biopelículas.....	81
9.16 Distribución de polisacáridos en el jugo de la hoja de agave.....	83
9.17 Fermentación láctica en las fracciones de la hoja del agave.....	86
9.18 Formación de biopelículas con el jugo de agave.....	93
10. Cumplimiento de objetivos de la tesis	96
11. Conclusiones.....	97
12. Perspectivas	99
13. Publicaciones	100
14. Referencias	101

Títulos de Tablas

Tabla 1. <i>Carbohidratos utilizados por las BAL</i>	17
Tabla 2. <i>Ejemplo de algunas BAL productoras de HoPS</i>	23
Tabla 3. <i>Ejemplos de algunas BAL productoras de HePS</i>	24
Tabla 4. <i>Características del agave pulquero</i>	34
Tabla 5. <i>Microrganismos utilizados en la investigación</i>	44
Tabla 6. <i>Factores evaluados en la formación de biopelículas</i>	50
Tabla 7. <i>Caracterización del jugo de la hoja del agave</i>	83
Tabla 8. <i>Análisis comparativo de las velocidades y crecimiento máximo de BAL en fructanos de agave y en jugo de agave</i>	91
Tabla 9. <i>Reducción de saponinas en el jugo de la hoja de agave</i>	94
Tabla 10. <i>Cumplimiento de objetivos</i>	96

Títulos de Figuras

Fig. 1 <i>Principales características del AcL.</i>	21
Fig. 2 <i>Etapas de la formación de las biopelículas</i>	25
Fig. 3 <i>Planta del agave</i>	31
Fig. 4 <i>Territorio en los que se cultiva el agave</i>	33

Fig. 5 Estructuras químicas de a) fructanos de agave, b) fructooligosacáridos y c) inulobiosa	36
Fig. 6 Estructura química de saponinas	38
Fig. 7 Crecimiento de BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> empleando diferentes fuentes de carbono.	57
Fig. 8 pH final en las fermentaciones lácticas de las BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> con distintas fuentes de carbono: glucosa, fructanos y fructosa	59
Fig. 9 Crecimiento específico de las BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> con distintas fuentes de carbono: glucosa, fructanos y fructosa. Biomasa inicial 8 g/L y carbohidrato inicial 20 g/L.	61
Fig. 10 Actividad fructosidasa en BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i>	63
Fig. 11 Rendimiento de producción de EPS con BALs, DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> y con diferentes fuentes de carbono	64
Fig. 12 Auto agregación de BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i>	66
Fig. 13 Hidrofobicidad de las BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> empleando diferentes solventes: cloroformo, acetato de etilo y xileno.	67
Fig.14 Formación de biopelículas con glucosa, fructanos y fructosa con las BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i>	69
Fig. 15 Formación de biopelículas con BALs, DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> a distintos pH utilizando como fuente de carbono fructanos.	71

Fig. 16 Formación de biopelículas con distintas BALs, DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> a distintas concentraciones de fructanos: 0, 10, 20 y 30 g/L	73
Fig. 17 Formación de biopelículas con BALs DG1 a DG8: <i>L. paracasei</i> , DG9: <i>E. faecium</i> y DG10: <i>L. delbrueckii</i> a distintos tiempos 3 y 5 días utilizando como fuente de carbono: fructanos de agave.	75
Fig. 18 Formación de biopelículas con distintas fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono. El testigo corresponde a una mezcla de proteínas (extracto de levadura, extracto de carne y peptona) adicionando la fuente de carbono al grupo de análisis.	77
Fig. 19 Imágenes de microscopía SEM de BAL: a) <i>L. paracasei</i> DG8, , b) <i>E. faecium</i> DG9 y <i>L. delbrueckii</i> NCFB 2772 DG10	80
Fig. 20 Producción de AcL en repetidos ciclos con perlas de polipropileno.	81
Fig. 21 Desfibrado de la hoja de agave para la separación del jugo, fibra y pulpa	82
Fig. 22 Distribución y abundancia de carbohidratos presentes en el jugo de la hoja de agave: (a) punta y (b) base	85
Fig. 23 Crecimiento de DG8 en las dos fracciones del jugo de agave después de 120 h de fermentación con un pH= 5.2±.3 y azúcares totales= 20 g/L ± 2.13	86
Fig. 24 Cinética de crecimiento de la punta del jugo de la hoja de agave después de 120 h de fermentación. El modelo (----) se ajusta a $(X_m - X_0)(1 - e^{-\mu t}) + X_0$	87
Fig. 25 Cinéticas de crecimiento de las dos fracciones de jugo de la hoja de agave a) punta y b) base durante 192 h de fermentación.	88
Fig. 26 Parámetros cinéticos de la fermentación del jugo de la hoja de agave con la bacteria DG8. a fracción de la punta y b fracción de la base	92
Fig. 27 Formación de biopelícula en el jugo de la hoja de agave en la fracción de la punta y base utilizando <i>L. paracasei</i> OM967272 DG8. La punta y base con	94

saponinas se refiere a que el jugo se aprovechó directamente y las que fueron con tratadas se mencionan sin saponinas. En una fermentación de 5 días en microplacas de poliestireno

Fig. 28 Disminución de saponinas en el jugo de agave mediante el método de Salkowski. Se representa el jugo de la hoja de agave después del tratamiento para la disminución de saponinas en (a) la punta y (b) la base. Los tubos (c) y (d) representan el jugo sin tratamiento en la punta y la base, respectivamente

95

Agradecimientos

Con todo mi aprecio, deseo expresar mi gratitud a todas las personas que me han acompañado en este camino. Su apoyo ha sido fundamental para mi desarrollo personal y profesional a lo largo de estos cuatro años de proyecto de tesis.

Primero que nada, quiero expresar mi agradecimiento a mi directora de tesis, la Dra. Alma Cruz Guerrero, por su infinita paciencia. Su orientación y apoyo durante esta etapa han dado frutos. Su calidad humana, experiencia y conocimientos han sido cruciales para mi desarrollo y me han inspirado a seguir adelante. Siempre será mi modelo a seguir tanto en lo personal como en lo profesional.

A mi estimado asesor, el Dr. Gustavo Viniegra González, quien siempre creyó en mí y que me integró a su equipo de trabajo. Su gran apoyo me ha motivado durante este tiempo a seguir creciendo y, sobre todo, me enseñó a apasionarme con mi investigación. Su entusiasmo, conocimiento y calidad humana me inspiran a seguir haciendo ciencia.

Al Dr. Luis Guillermo González Olivares, quien amablemente decidió formar parte de este proyecto como asesor.

A mis profesores, la Dra. Cristina Acosta, el Dr. Cristian Mora, el Dr. Ernesto Favela y la Dra. Rosa Camacho, gracias por su cariño. Siempre estuvieron para apoyarme incondicionalmente, y sus consejos fueron clave para el desarrollo de mi proyecto. Sus ideas y sugerencias han sido de gran ayuda.

A mis compañeros de laboratorio de la pp2 y pp4, gracias por su colaboración, amistad y por hacer de cada día una experiencia enriquecedora.

A mi familia, por creer en mí en todo momento y motivarme constantemente. Su apoyo emocional ha sido crucial para alcanzar este logro. Especialmente a mis padres, Alma Lucero y José Luis Martha, quienes desde mi infancia me han apoyado y han buscado mi felicidad. Gracias por siempre impulsarme y ayudarme a crecer.

A mi esposo, Isaac García, quien siempre me apoya y me motiva a seguir con mis sueños. Gracias por todo el cariño y la paciencia.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud a la UAM por proporcionarme los recursos y el entorno adecuado para realizar esta investigación durante mi etapa de tesis doctoral.



Abreviaturas

AcL : Ácido Láctico

BAL: Bacterias ácido-lácticas

CAGR: Tasa de Crecimiento Anual Compuesta

CAM: Crassulacean Acid Metabolism

DO: Densidad Óptica

EPS: Exopolisacáridos

Fig.: Figura

GP: Grado de polimerización

GRAS: Generalmente Reconocida como Segura

HePS: Heteropolisacáridos

HoPS: Homopolisacáridos

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficacia

IR: Frecuencia infrarroja

μ : Tasa de velocidad de crecimiento específico

MRS: Medio de cultivo Man Rogosa Sharpe

NCBI: National Center for Biotechnology Information

PLA: Ácido Poli-láctico

QS: Quorum sensing

SBF: Solución Salina de Fosfatos

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido

TD: Tiempo de duplicación

UFC: Unidad Formadora de Colonia

(Y p/s): Rendimiento producto sobre sustrato

Y (x/s): Rendimiento biomasa sobre sustrato



Resumen

El mercado global de ácido láctico (AcL) se valoró en \$3.37 mil millones de dólares en 2023, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) proyectada del 8% para 2030. Esta proyección se debe a la creciente demanda de AcL en las industrias alimentaria, química, farmacéutica y cosmética. Además, la necesidad de reducir el uso de plásticos derivados del petróleo y la adopción de polímeros biodegradables y renovables, como el ácido poliláctico derivado del AcL, han impulsado positivamente su demanda.

La producción de AcL se basa principalmente en carbohidratos obtenidos del almidón de maíz y la caña de azúcar. Sin embargo, se ha encontrado que los fructanos del agave también pueden ser utilizados para producir AcL. Al usar el jugo de la hoja de agave en fermentaciones lácticas, se añade un valor integral al agave.

El objetivo de este estudio fue evaluar las condiciones para la formación de biopelículas de BAL aisladas del agave, para una posterior aplicación en la transformación de fructanos de agave en AcL.

Los resultados indicaron que las bacterias ácido-lácticas (BAL) aisladas del agave, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus*, pueden formar biopelículas robustas con fructanos comerciales de agave sin necesidad de hidrólisis previa. La cepa más efectiva fue *Lactobacillus paracasei* DG8, con un valor de (DO=4.64). Además, se identificaron las condiciones óptimas para la formación de biopelículas: 30 g de fructanos comerciales de agave, una mezcla de proteínas (extracto de levadura, peptona y extracto de carne), un pH inicial de 6.5 y un tiempo de fermentación de 5 días. Con esta cepa, fue posible reutilizar las biopelículas en tres ciclos para la producción de AcL, triplicando el rendimiento en comparación con las células planctónicas y facilitando la separación del producto y la biomasa.

Por otro lado, se analizó la posibilidad de utilizar el jugo de la hoja de agave para la formación de biopelículas y un futuro aprovechamiento en la producción de AcL. En la caracterización se encontró predominancia de oligosacáridos (entre 60 y 75%) entre los



carbohidratos analizados. Estos carbohidratos fueron aprovechados en forma planctónica por el microorganismo para su crecimiento obteniendo crecimiento máximo (X_{Max}) = 13 g/L y un rendimiento producto sobre sustrato ($Y_{p/s}$) = 95.35%. Estos resultados indicaron que el jugo de la hoja de agave sin la adición de ningún nutriente es un medio que podría ser aprovechado para la producción de AcL. Adicionalmente en los estudios para la formación de biopelículas con jugo de la hoja de agave, se demostró que las saponinas impiden la formación de biopelículas, ya que al alcanzar niveles de concentración de 48.11% se logra la formación de biopelículas (DO=0.379).

Es importante señalar que este trabajo es una pequeña contribución a un proyecto global donde se aprovecha la hoja de agave de forma integral. La pulpa se utiliza para ensilados y producción de compuestos bioactivos, la fibra para enriamiento microbiano y aprovechamiento en textiles, y el jugo para fermentaciones lácticas.

En conclusión, los hallazgos de este estudio indican que este trabajo constituye una contribución importante, allanando el camino para la producción de AcL a partir del jugo de las hojas de agave, aprovechando la generación biogénica de biopelículas por BAL.



1. Introducción

El ácido láctico (AcL) es considerado generalmente seguro como producto alimentario (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (Serna & Stouvenel, 2005). Este producto es diversamente utilizado en industrias, tales como la química, la agrícola, la farmacéutica, la dermatológica y la alimentaria (Serna & Stouvenel, 2005). La demanda global de AcL ha crecido notablemente, alcanzando un valor de \$3.37 MMD en 2023, con una tasa de crecimiento anual compuesta (CAGR) proyectada del 8% para 2030 (Grand View Research, 2024). Por lo tanto, se anticipa que la producción seguirá creciendo debido al incremento en la popularidad de los plásticos biodegradables, como el ácido poli-láctico (PLA), un polímero derivado del AcL (Wang *et al.*, 2013; Aziz *et al.*, 2021)

El PLA, un plástico biodegradable, se destaca como uno de los materiales más prometedores para reemplazar los plásticos convencionales derivados del petróleo, gracias a su capacidad para reducir los impactos negativos en el medio ambiente (Taib *et al.*, 2023). El mercado global de PLA fue valorado en alrededor de \$713.22 MMD en 2023, y se proyecta una tasa CAGR del 21.4 % entre 2024 y 2030 (Grand View Research, 2024). Los principales productores de PLA a nivel mundial, NatureWorks (de maíz en EE. UU.) y TotalEnergies Corbion (de caña de azúcar en Tailandia) (Pinlova *et al.*, 2024)

En principio, el 90% de la obtención de AcL a nivel industrial se realiza por fermentación con BAL. Debido a que la síntesis química tiene la desventaja de producir una mezcla racémica de AcL (D- y L-) el *Lactobacillus delbrueckii* es el microorganismo más utilizado para evitar este inconveniente (Datta & Henry, 2006; Martínez *et al.*, 2013; Aziz *et al.*, 2021; Parra-Huertas, 2008). Aún así, las BAL, pueden aprovechar carbohidratos complejos, como los fructanos ramificados del agave para la producción de AcL (Martha-Lucero, 2018). Además, otra ventaja del uso de las BAL es su capacidad para formar biopelículas, que son conjuntos de bacterias adheridas a una superficie y rodeadas de exopolisacáridos (EPS). El objetivo de la producción de estas biopelículas es proteger a las BAL actuando



como un sistema de defensa contra el estrés nutricional y ambiental (Huerta *et al.*, 2010; Martha-Lucero, 2023).

Sin embargo, el sustrato más utilizado en la fermentación industrial de AcL es la glucosa derivada de la hidrólisis del almidón de maíz (Vink & Davies, 2015). Aún cuando México es productor de maíz, también es un gran importador de este grano. Tal sería el caso del agave cuya producción es ampliamente conocida, además, el agave puede ser cultivado en zonas semi desérticas. Este es el caso de los agaves, con la ventaja de que estas plantas tienen una alta eficiencia de desarrollo con respecto al uso de agua, la cual es cinco veces mayor a la del maíz (Mendoza, 2007). En México, se cultivan más de 100 mil hectáreas destinadas a la producción de tequila, mezcal y pulque (Consejo Regulador del Tequila, 2024) y más del 40% de las hojas no son aprovechadas adecuadamente. Por lo tanto, al ser las hojas un residuo agroindustrial con una concentración de fructanos de 25.3% (base seca), se justifica el estudio de la fermentación láctica a partir de estos carbohidratos, incluyendo la formación de biopelículas por las BAL que han sido aisladas de los agaves.

En este sentido, las biopelículas de BAL permiten disminuir los requerimientos nutricionales en el consumo de proteína y también favorecen una mayor transformación de carbohidratos en AcL. Además, estos biogénicos facilitan la separación del producto durante la fermentación mejoran la viabilidad de las BAL y aumentan la densidad celular local. Estas ventajas contribuyen a la optimización de las fermentaciones lácticas (Demirci *et al.*, 1995).

Es importante señalar que este trabajo contribuye a un proyecto global donde se aprovecha la hoja de agave de forma integral. La pulpa se utiliza para ensilados (Alcantar-Morales *et al.*, 2024) y producción de compuestos bioactivos (Gallardo-Martínez, 2023), la fibra para enriamiento microbiano y aprovechamiento en textiles (Piñón-Herrera, 2024), y el jugo para fermentaciones lácticas que será evaluado en este trabajo.



Es por ello por lo que, el objetivo de este trabajo ha sido la evaluación de las condiciones para la formación de biopelículas de BAL aisladas del agave, para una posterior aplicación en la transformación de fructanos de agave en AcL.

Asimismo, otro de los objetivos fue utilizar el jugo de la hoja de agave como medio de cultivo para las fermentaciones lácticas y la formación de biopelículas, sin necesidad de añadir nutrientes externos.



2. Marco teórico

2.1 Bacterias ácido-lácticas (BAL)

Las BAL pertenecen al grupo de bacterias Gram positivas, no esporuladas, con morfología de bacilos y cocos, facultativamente anaeróbicas, catalasas negativas, no móviles y tienen como principal producto de la fermentación al AcL, especialmente si pueden expresar la enzima aldolasa la cual fragmenta el difosfato de fructosa en dos triosas (Sossa *et al.*, 2009). Estos microorganismos poseen una notable resistencia a ambientes ácidos, permitiéndoles sobrevivir en condiciones de pH de 5 o incluso inferiores. Además, otro factor que puede variar según el género es la temperatura óptima de crecimiento, que oscila entre 20 y 45 °C (Hofvendahl & Hahn, 2000).

Las BAL producen una gran variedad de enzimas como: lactasa, proteasas, peptidasas, fructanasas, amilasas, hidrolasas de sales biliares, fitasas y esterases que les permiten asimilar los nutrientes del medio (Maske *et al.*, 2021). Además, se ha demostrado que tienen la capacidad de formar biopelículas. Las biopelículas son agrupaciones de microorganismos organizados y adheridos a una superficie viva o inerte (Rivera & Desgarenes, 2010). Dichas biopelículas protegen a los microorganismos de condiciones de estrés ambientales (pH, temperatura, oxígeno y ósmosis) y nutricionales (Rivera & Desgarenes; Nazar, 2007).

2.1.1 Requerimientos nutricionales

Las BAL presentan exigentes necesidades nutricionales. Además de requerir carbohidratos fermentables y una fuente de nitrógeno, necesitan una gran cantidad de nutrientes esenciales como péptidos, vitaminas, aminoácidos, minerales y bases nucleotídicas para realizar sus funciones vitales (Freire *et al.*, 2021).

2.1.2 Fuente de carbono

Las BAL requieren como fuente de carbono carbohidratos que se transforman en AcL



principalmente y otros productos como etanol y ácido acético. Estas bacterias, utilizan carbohidratos simples como monosacáridos (glucosa, fructosa, galactosa) para realizar su metabolismo. Sin embargo, hay estudios en los cuales se ha reportado su capacidad de utilizar disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos (**Tabla 1**) (Hofvendahl & Hahn, 2000).

Tabla 1. Carbohidratos utilizados por las BAL

Carbohidrato	Fuente	GP*	Microorganismos	Enzimas reportadas	Referencia
Almidón	Almidón de papa soluble	>20	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> B84	α -amilasas citoplasmáticas y extracelulares, glucógeno fosforilasa y amilopululanasa	Petrov <i>et al.</i> , 2008
Fructo-oligosacáridos Lineales	Extracto de tubérculo de alcachofa de Jerusalén	<13	<i>L. paracasei</i> KCTC13169	inulinasas e invertasa	Choi <i>et al.</i> , 2012
Fructo-oligosacáridos ramificados	Agave	<10	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. rhamnosus</i> .	β - fructosidasas	Santiago-García & López, 2009
Fructanos ramificados	Agave	GP<30	<i>Lactobacillus salivarius</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	β - fructosidasas	Ayala-Monter <i>et al.</i> , 2018

Fructo- oligosacáridos tipo Lévano	Pan	GP= 3 – 10	<i>Lactobacillus crispatus DSM29598</i>	exo- β - fructosidasas	Li <i>et al.</i> , 2020
---	-----	------------	---	---------------------------------	----------------------------

*GP: Grado de polimerización

La capacidad de las BAL para asimilar carbohidratos complejos se debe a la acción de glucosidasas, que son enzimas con actividad hidrolítica y que, en ciertas condiciones, pueden actuar como transferasas. Las glucosidasas suelen ser nombradas según el sustrato sobre el que actúan. Por ejemplo, las enzimas que catalizan el almidón son las amilasas, que hidrolizan los enlaces α -(1-4) en cadenas no ramificadas o escasamente ramificadas mediante enlaces α -(1-6). En el caso de los fructanos, las enzimas responsables son las fructano hidrolasas, o también conocidas como, fructosidasas o inulinasas, que hidrolizan los enlaces β -(2-1) que liberan fructosa. Este diverso grupo de enzimas muestra una amplia gama de especificidades de sustratos (Alberto *et al.*, 2004; Ávila-Fernández *et al.*, 2009).

2.1.3 Fuente de nitrógeno

Las BAL requieren proteínas, péptidos o aminoácidos para poder reproducirse ya que carecen de sistemas biosintéticos para crecer en fuentes simples de nitrógeno (Pritchard *et al.*, 1993). Algunos de los aminoácidos requeridos por las BAL son: ácido glutámico, glicina, leucina, isoleucina, histidina, metionina y valina (Kieliszek *et al.*, 2021). Sin embargo, las auxotrofías son dependientes de la especie.

Por otra parte, el metabolismo de los aminoácidos incluye la desaminación y la descarboxilación. Por su parte, la reacción de desaminación produce diversos ácidos α -carboxílicos, que intervienen en diversas rutas metabólicas en las BAL. En este contexto, los aminoácidos pueden generar una variedad de aminas biógenas bajo la acción de la descarboxilasa de las BAL. Así mismo, el amoníaco sintetizado durante la desaminación de los aminoácidos aumenta el valor del pH dentro y fuera de la célula, protegiéndola así del estrés ácido (Wang *et al.*, 2021).



2.1.4 Vitaminas y Minerales

A diferencia de otros nutrientes, las vitaminas no cumplen funciones estructurales ni actúan como fuente de energía. En cambio, actúan como cofactores esenciales en los sitios activos de diversas enzimas que catalizan reacciones metabólicas cruciales. Muy pocas BAL pueden sintetizar vitaminas del grupo B. Por lo tanto, es esencial incorporar estas vitaminas en el medio de cultivo (Leblanc *et al.*, 2020).

Por su parte, los minerales también son necesarios en la nutrición de las BAL, ya que las enzimas también requieren cationes metálicos como cofactores (Co^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} y Mg^{2+}). Por ejemplo, algunas BAL en concentraciones altas de Mn^{2+} aumentan fuertemente la actividad de la β -fructosidasas, favoreciendo más de un 30% la transformación de fructanos a AcL; además son clave en el transporte de azúcares (Petrova *et al.*, 2015).

Asimismo, el Mg^{2+} es un componente crucial en la fermentación láctica, ya que interviene en diversos procesos, como el transporte de otros iones a través de la membrana celular, lo cual es esencial para mantener el equilibrio iónico y el pH adecuado dentro de las células. (Téllez-Luis, 2003).

2.2 Tipos de fermentación láctica

La fermentación láctica es un proceso metabólico en el cual las BAL consiguen la energía necesaria para realizar sus funciones vitales, transformando los carbohidratos en otros productos, principalmente AcL (Serna & Stouvenel, 2005). Estos microorganismos se clasifican en homofermentativos (AcL como único producto) y heterofermentativas (producen AcL y otros compuestos como, etanol, acetato y dióxido de carbono).

Las BAL homofermentativas contienen enzimas como la aldolasa y la hexosa isomerasa, lo que les permite utilizar la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas para transformar una molécula de glucosa en dos moléculas de ácido láctico. Este proceso tiene un rendimiento teórico del 100%; sin embargo, en condiciones prácticas, se alcanza aproximadamente un 85% debido a la formación de productos secundarios y a la síntesis de biomasa, que

consume habitualmente alrededor del 10% del carbono disponible (Huertas, 2010).

Las BAL heterofermentativas tienen un rendimiento teórico máximo del 50%, mientras que la otra parte se distribuye en la producción de ácido acético, etanol y CO₂ (Huertas, 2010). Este grupo de bacterias producen enzimas como: aldolasa y hexosa isomerasa, además de la fosfocetolasa que las inducen a la vía de la hexosa monofosfato o también conocida como la de la pentosa (Huertas, 2010; García *et al.*, 2007).

2.3 Ácido láctico (AcL)

El AcL se presenta como una molécula quiral con dos enantiómeros ópticos levógiro (L-) y dextrógiro (D-) los cuales tienen características distintas, la orientación levo es oxidada y metabolizada por el organismo humano, caso contrario con la orientación dextro que es tóxica. En la fermentación es posible controlar la configuración del AcL utilizando diferentes especies de BAL lo que permite el uso del producto para algunas aplicaciones especializadas (Serna & Stouvenel, 2005; Datta & Henry, 2006; Mora *et al.*, 2020).

Los isómeros L- y D-, son importantes según el área de aplicación. Para el caso de los sectores de alimentos, bebidas y cuidado personal se utiliza el ácido L-(+)-láctico que es metabolizado por el ser humano (García *et al.*, 2007; Taylor 1996). En la naturaleza, los isómeros se presentan en estado líquido, son inodoros, de consistencia siruposa y corrosivos para metales y tejidos. La **Fig 1** se detallan otras propiedades fisicoquímicas del AcL

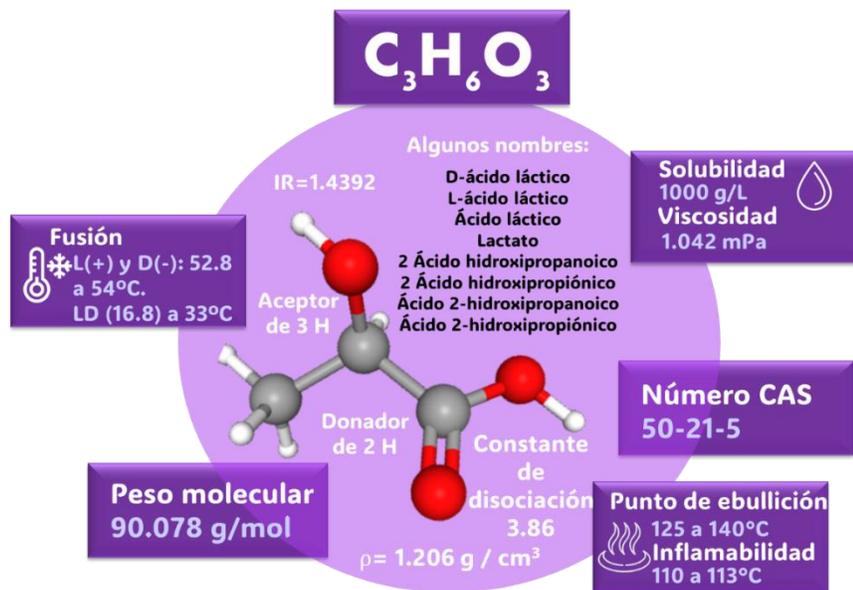


Fig. 1 Principales características del AcL. La fórmula molecular del AcL se destaca en la parte superior. Se incluye varios datos sobre el AcL, como sus nombres, solubilidad en agua, viscosidad y número CAS. También proporciona propiedades físicas como el peso molecular, densidad, punto de ebullición y punto de inflamabilidad. Además, se mencionan su constante de acidez pK_a de y una frecuencia infrarroja (IR). La imagen central muestra una representación tridimensional de la molécula con átomos codificados por colores: rojo para oxígeno, gris para carbono y blanco para hidrógeno. Fuente: (NCBI, 2024).

2.4 Exopolisacáridos producidos por las BAL

Los exopolisacáridos (EPS), son producidos para la protección celular del estrés producido por factores ambientales como los compuestos inhibitorios o la concentración excesiva de azúcares o sales. Por lo tanto, el estrés y condiciones de crecimiento promueven la producción de dichos EPS. Se ha demostrado que, al variar los parámetros óptimos del oxígeno disuelto, pH, temperatura y la composición del medio, se puede aumentar la producción de EPS (Schiraldi *et al.*, 2006).

La producción de EPS por las BAL tiene un gran potencial biotecnológico, principalmente en alimentos, ya que confiere características tecnológicas tales como, la de emulsionantes,

espesantes, gelificantes y recubrimientos alimentarios. Por otro lado, en farmacéutica se ha encontrado que los EPS pueden retener la humedad en adhesivos quirúrgicos para heridas, andamios tisulares. Además, en cosmetología se emplea como un agente hidratante para la piel (Daba *et al.*, 2020).

2.4.1 Tipos de EPS

Existen dos tipos de EPS, según la variedad de los constituyentes: homopolisacáridos (HoPS), que están constituidos por un solo tipo de monosacárido y el otro tipo son los heteropolisacáridos (HePS), en donde los monosacáridos son diferentes y típicamente consisten en 2 a 8 tipos distintos de monosacáridos (Schiraldi *et al.*, 2006; Degeest & De Vuyst, 1999). La regulación de las vías biosintéticas y el tipo de EPS depende de la fuente de carbono y nitrógeno (Schiraldi *et al.*, 2006; Kruk & Trzaskowska, 2021).

2.4.1.1 Homopolisacáridos (HoPS)

Estos compuestos se sintetizan generalmente en la matriz extracelular por una glicosiltransferasa extracelular y un donante de azúcar extracelular. La síntesis consiste en dos etapas, en las cuales están involucradas las glicosiltransferasas. Un medio de cultivo estudiado para la producción de HoPS es el MRS compuesto principalmente con glucosa, (Palomba *et al.*, 2012; De Man *et al.*, 1960). De igual manera, se ha descubierto que el extracto de levadura es eficaz para la producción de HoPS debido a su mayor biodisponibilidad de aminoácidos y vitaminas necesarias para las BAL (Hernández-Rosas *et al.*, 2021; Kruk & Trzaskowska, 2021).

Algunos HoPS reportados son: los glucanos (como dextranos, mutanos y reuterano); los fructanos (como lévianos) y el poligalactano (como carragenina). En la **Tabla 2** se mencionan ejemplos de BAL que producen HoPS (Mayer *et al.*, 2020; Welman *et al.*, 2003).

Tabla 2. Ejemplo de algunas BAL productoras de HoPS

HoPS producido	BAL	Fuente de carbono	de Referencia
α-D-glucanos	<i>Lactobacillus johnsonii</i> FI9785	glucosa	Mayer <i>et al.</i> , 2020
	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> B40	lactosa	Welman <i>et al.</i> , 2003
	<i>Weissella cibaria</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i>	sacarosa	Cagno <i>et al.</i> , 2006
β-D-glucanos	<i>Lactobacillus reuteri</i>	glucosa	Ruas <i>et al.</i> , 2002
	<i>Pediococcus</i> spp.	glucosa	De Vuyst & Degeest, 1999
	<i>Streptococcus</i> spp.		
Fructanos	<i>Lactobacillus reuteri</i> LB 121	sacarosa	Monsan <i>et al.</i> , 2001
	<i>W. cibaria</i> , <i>L. plantarum</i> , and <i>P. pentosaceus</i>	sacarosa	Cagno <i>et al.</i> , 2006
Poligalactano	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i> H414	sacarosa	Ruas <i>et al.</i> , 2002

2.4.1.2 Heteropolisacáridos (HePS)

Los HePS se forman repitiendo unidades que contienen una combinación de glucosa, xilosa, fructosa, galactosa, manosa, ramnosa, *N*-acetil glucosamina, *N*-acetilgalactosamina o ácido glucurónico. En la **Tabla 3** se muestran algunos ejemplos de HePS producidos por BAL (Ruas *et al.*, 2002).

La síntesis de HePS inicia cuando un carbohidrato se une al transportador lipídico fosforilado situado en la membrana citoplasmática gracias a proteínas transportadoras como las permeasas. Una vez en el interior de la membrana, actúan las glicosiltransferasas intracelulares que a partir del monosacárido forman los disacáridos, en ese momento se encuentran anclados a la lámina interna de la membrana a través de lípidos, los cuales permitirán que el disacárido se reacomode en la capa externa de la membrana y ahí continúe con la polimerización (Monsan *et al.*, 2001; De Vuyst & Degeest, 1999).

Tabla 3. Ejemplos de algunas BAL productoras de HePS

HePS producido	BAL	Fuente de carbono	de Referencia
Glucosa +galactosa	<i>Lactobacillus johnsonii</i> FI9785.	glucosa	Dertli <i>et al.</i> , 2013
Galactosa+ glucosa	<i>Streptococcus thermophilus</i>	lactosa	De Vuyst & Degeest, 1999
Glucosa + ramnosa	<i>Lactobacillus sake</i>	glucosa, galactosa y lactosa	Degeest <i>et al.</i> , 2001
Glucosa + fructosa	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> CRL 420	glucosa	Manca de Nadra <i>et al.</i> , 1985
Galactosa + glucosa + ramnosa	<i>Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus</i> NCFB 2772	lactosa	Grobben <i>et al.</i> , 1996
Glucosa + galactosa + ramnosa	<i>Lactobacillus collinoides</i>	sacarosa	González, 2019

2.5 Biopelículas

Las biopelículas son agrupaciones de bacterias que se adhieren entre sí y a una superficie, ya sea viva o inerte, mediante sustancias poliméricas extracelulares, conocidas como EPS (Karygianni & Zehnder, 2021). Una vez formada la biopelícula, los microorganismos actúan como una comunidad que vive, se organiza, interactúa y funciona de diferente forma que las células libres o planctónicas (Salas *et al.*, 2021; Karygianni & Zehnder, 2021; Arnaouteli *et al.*, 2021).

El proceso para la formación de biopelículas presenta cuatro etapas: adhesión primaria, formación de micro colonias, maduración y disgregación (Fig. 2).

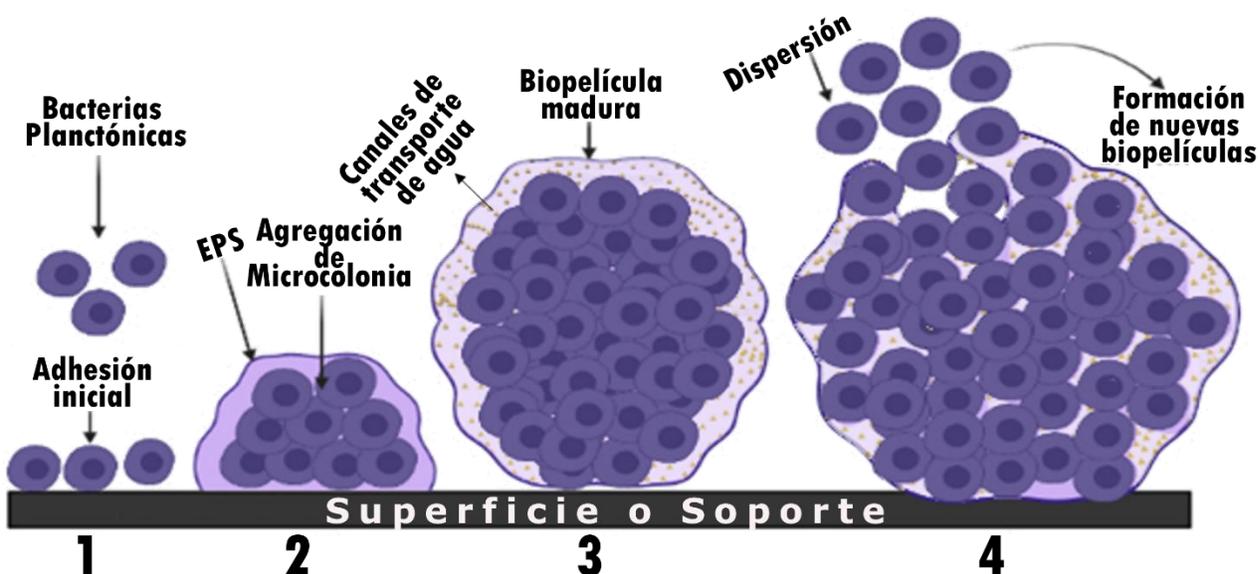


Fig. 2 Etapas de la formación de las biopelículas (Fuente: Autoría propia)

En la etapa de adhesión primaria las bacterias planctónicas comienzan a producir proteínas adhesivas en la superficie externa de la membrana plasmática celular. Estas favorecen la

unión inicial con la superficie o soporte. Las características del soporte que permiten la unión son: la energía libre superficial, la rugosidad, la hidrofobicidad, la permeabilidad y la resistencia. Esta etapa es reversible, las bacterias aún no se encuentran en proceso de diferenciación, ya que no hay modificaciones en su expresión génica, por lo tanto, algunas de las células se desprenden del soporte y regresan al estilo de vida planctónico (Singh *et al.*, 2021; Bermúdez & Díaz 2016; Cazzaniga *et al.*, 2015).

La segunda etapa, es la formación de micro colonias, la cual comienza con la proliferación y la unión entre células. Durante esta etapa, la densidad celular aumenta desencadenando la producción de señales químicas que están implicadas en el sistema regulatorio *quorum sensing* (QS) el cual se define como un mecanismo de comunicación intercelular que permite coordinar actividades en grupo de las bacterias (Kareb & Aïder, 2020). Al multiplicarse las bacterias, forman capas organizadas de células (vivas, persistentes y muertas) que están rodeadas por EPS. Los EPS tienen la función de proteger a las células y fortalecer la adhesión entre ellas y el soporte sólido de anclaje (Veerachamy *et al.*, 2014).

La tercera etapa, es la maduración. En esta etapa la biopelícula alcanza una masa crítica, se forma una macro colonia y se utiliza el sistema genético del QS para coordinar un comportamiento comunitario. Al mismo tiempo las células utilizan los canales que se encuentran en la glucocálix para la microcirculación de agua y nutrientes para la colonia. Sin embargo, en algunas zonas del agregado, no es posible la distribución de nutrientes y las células mueren o se inactivan. Las células inactivas, las cuales son conocidas como persistentes, sobreviven sin consumir nutrientes, sin reproducción y se vuelven resistentes a factores de estrés ambiental. Las bacterias persistentes cuando tienen los requerimientos necesarios para su crecimiento cambian su metabolismo y se transforman a bacterias con una función de células vivas (alimentación, reproducción y muerte). Por su parte, las bacterias muertas, sirven como nutrientes debido a que sus organelos son componentes orgánicos que contienen carbohidratos, proteínas, lípidos y micronutrientes (Rivera & Desgarenes, 2010; Veerachamy *et al.*, 2014).

Durante la disgregación, las células que se encuentran menos ancladas se dispersan y se inicia de nuevo el ciclo de formación de biopelículas (Rivera & Desgarenes, 2010).

Finalmente, las propiedades de la matriz también desempeñan papeles importantes en el proceso de formación de biopelículas (Yuan *et al.*, 2020).

Una ventaja adicional de los sistemas de fermentación que emplean biopelículas es la alta densidad celular, que mejora la estabilidad y permite el uso repetido del soporte durante muchos lotes de fermentación repetidos sin reiniciación, así como una menor necesidad de purificación posterior del compuesto de interés (Bastarrachea *et al.*, 2022).

2.6 Soportes para la formación de biopelículas

Los materiales de soporte para formar biopelículas son importantes para el éxito de la formación de biopelículas. El soporte debe favorecer la adhesión de microorganismos, tener una alta resistencia mecánica a las fuerzas de cizallamiento del líquido y a la colisión de partículas. Además, se debe considerar el efecto de algunas de las propiedades del soporte sólido, como la carga superficial, la hidrofobicidad, la porosidad, la rugosidad y la densidad (Kim *et al.*, 2022).

La formación de biopelículas es un proceso de inmovilización pasiva en el cual los microorganismos se adhieren inicialmente mediante la formación de enlaces covalentes entre los grupos funcionales químicos presentes en las células y los del soporte sólido (bio conjugación). Estas interacciones, inicialmente reversibles y débiles, se vuelven irreversibles gracias a los apéndices adhesivos bacterianos y la producción de EPS, que pueden formar puentes entre las células y el soporte sólido. La unión irreversible se refuerza mediante múltiples interacciones covalentes, iónicas, dipolo-dipolo e hidrofóbicas. Una vez establecida la biopelícula, las células contenidas en ella son capaces de producir metabolitos de interés (Bastarrachea *et al.*, 2022).

Se han evaluado distintos soportes en el área de las fermentaciones, los cuales incluyen, espumas de poliuretano, poliestireno, cloruro de polivinilo clorado y polipropileno, para la formación de la biopelícula de BAL (Van *et al.*, 2010; Demerci *et al.*, 1995).

Uno de los plásticos que están ampliamente reportado como soporte, es el polipropileno, el aprovechamiento de este termoplástico es debido a sus características, las cuales son: no polar, rígido, duro y tiene una excelente resistencia al impacto (Lapo-Calderón, 2014).

Asimismo, el uso del polipropileno tiene las ventajas de permitir el transporte del agua a través del soporte, además de tener resistencia química y cambios mecánicos. También, se caracteriza por un peso específico bajo, mínima rugosidad, resistencia a fisuras de tensión, baja conductividad térmica. Además, se puede utilizar para la producción de AcL con fines de alimentos y farmacología, porque el polipropileno tiene características organolépticas de sabor neutro, sin color y olor (Maurya & Manik, 2023).

En otros estudios, como el de Demerci *et al.* (1995), se observó un aumento de casi cuatro veces en la productividad de AcL al utilizar polipropileno con un 20% de una mezcla de cáscara y harina de soya, en comparación con las fermentaciones de cultivos planctónicos.

Una de las explicaciones de las ventajas del polipropileno fue descrita por Ho *et al.* (1997), quienes mencionan que la producción de AcL esta correlacionada con la densidad de células suspendidas, además de que el polipropileno propicia el aumento de población por la alta hidrofobicidad de la superficie.

2.7 Producción de AcL con biopelículas

Existen pocas investigaciones en donde se hayan utilizado BAL para la producción de AcL en biopelículas, sin embargo, éstas se han incrementado en los últimos años.

Demirci & Pometto III (1995), aumentaron la productividad hasta seis veces utilizando biopelículas de *Lactocaseibacillus* subsp. *ramnosus* (ATCC 11443) en soportes de polipropileno mezclados con 20% de cáscaras de avena y 5% de zeína en un proceso



continuo de fermentación, donde las biopelículas lograron ser viables durante 25 días, obteniendo producto cada 3 días por 2 meses.

Ho *et al.* (1997) demostraron que el uso de biopelículas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 11443, desarrolladas en soportes compuestos por 50% de polipropileno y 50% de residuos agroindustriales (como cáscaras de soja, extracto de levadura, harina de soja, albúmina bovina y sales minerales), mejora significativamente la tasa de fermentación al requerir una menor adición de nutrientes complejos. Este enfoque incrementó más de cuatro veces la productividad máxima en comparación con células planctónicas y permitió una mayor tolerancia a concentraciones iniciales elevadas de glucosa (100 g/L) y bajas concentraciones de extracto de levadura (0.8%).

Por otro lado, Velázquez *et al.* (2001) emplearon soportes similares para formar biopelículas de *L. rhamnosus* (ATCC 11443) en biorreactores de lotes repetidos, logrando una productividad de AcL de 2.45 g/L·h, superando a los 1.75 g/L·h obtenidos con células planctónicas. Además, las biopelículas alcanzaron rendimientos del 95% frente al 85% de las células planctónicas, con tasas de consumo de glucosa de 3.27 g/L·h en comparación con 2.09 g/L·h. También se evidenció la relevancia del nitrógeno como factor clave, indicando que 2 g/L de extracto de levadura eran necesarios para maximizar la productividad de AcL en las biopelículas.

Cotton *et al.* (2001) confirmaron estos hallazgos utilizando un reactor agitado con soportes de polipropileno mezclados con 50% de materia orgánica (cáscaras de soja, extracto de levadura, harina de soja, albúmina bovina y sales minerales). Sus experimentos alcanzaron tasas de producción promedio óptimas de 5.8 a 9 g/L·h. Asimismo, demostraron que el aumento de la velocidad de agitación de 100 a 125 rpm mejoró los rendimientos, alcanzando un 70% frente al 63% obtenido a menor velocidad.

Más recientemente, Cuny *et al.*, (2019) realizaron una fermentación en un sistema continuo que duró más de 3 semanas, utilizando biopelículas de *L. delbrueckii* en soportes de polietileno. Obtuvieron una producción de AcL que alcanzó el 80% del valor máximo

después de 10 días y no se observó una disminución posterior, lo que confirma la idoneidad de este sistema para el cultivo a largo plazo. Además, encontraron en la fermentación planctónica la inhibición de la fermentación por producto y bajo pH. Lo cual no ocurre en las biopelículas, debido a que la biopelícula le da protección a las BAL contra condiciones extremas de acidez.

Rangaswamy *et al.* (2008) demostraron la viabilidad de un sistema de reactor dual integrado para la producción continua de AcL, logrando una productividad de 5 g/L·h. Este sistema utilizó biopelículas de *L. delbrueckii* NCIM 2365 desarrolladas en espuma de poliuretano reticulado, el cual resultó ser un excelente soporte para la formación de biopelículas y tuvo un funcionamiento continuo de 1000 h sin aumentar el inóculo y sin comprometer la productividad.

En general, la producción de AcL depende de numerosos parámetros que influyen en la dinámica del bioproceso. Estos incluyen las características de las BAL, las configuraciones del reactor, la fuente de carbono, la fuente de nitrógeno, el tipo de soporte, así como la cantidad y el estado de salud de la biomasa inmovilizada (Dagher *et al.*, 2010). Asimismo, las biopelículas permiten tolerar ambientes peligrosos, debido a las propiedades protectoras de los EPS y cambios en la fisiología celular (Leonov *et al.*, 2021).

2.8 Importancia del agave

Los agaves son plantas monocárpicas y perennes pertenecientes a la familia *Agavaceae* (Suárez, 2016). Su reproducción puede ser sexual o asexual; la reproducción sexual ocurre cuando las semillas de las flores del qurote son polinizadas, mientras que la reproducción asexual se realiza mediante los hijuelos que se desarrollan en la base del tallo de la planta madre (Barrientos-Rivera, 2019).

En la **Fig. 3** se observa la anatomía del agave, siendo el tallo el principal órgano de almacenamiento de agua y donde se sintetizan carbohidratos de reserva como los fructanos, posteriormente este madura y se convierte en la piña o cabeza. Además, el tallo está envuelto por las hojas que son de una cutícula gruesa, recubiertas de cera, y la



presencia de estomas complejos que ayudan a proteger y evitar la pérdida de agua (Tafolla-Arellano *et al.*, 2013). Asimismo, presentan un sistema de raíces superficiales que permiten la captación eficiente de mínimas cantidades de agua (Martha-Lucero, 2018).

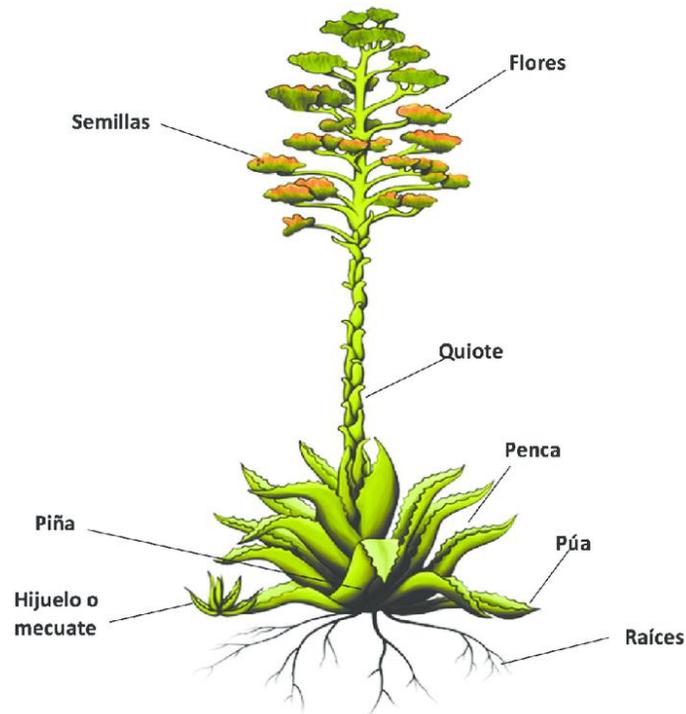


Fig. 3 Planta del agave (Fuente: Suárez,2016)

La adaptación clave del agave a ambientes con escasez de agua radica en su metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, por sus siglas en inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*) (Flores *et al.*, 2022). Este mecanismo permite que la planta mantenga sus estomas cerrados durante el día y los abra por la noche para absorber CO₂, reduciendo así la pérdida de agua por transpiración. Los ácidos orgánicos se descomponen para liberar dióxido de carbono, que luego se utiliza en el ciclo de Calvin para la síntesis de azúcares (Escamilla-Treviño, 2012).

El ciclo de Calvin ocurre en el estroma de los cloroplastos, donde se lleva a cabo la fase oscura de la fotosíntesis, durante este proceso el dióxido de carbono se fija y se convierte en glucosa, la cual posteriormente se combina con fructosa para formar sacarosa dentro de

los cloroplastos (Raines, 2003). La sacarosa actúa como precursor para la síntesis de fructanos gracias a la acción de enzimas como la sacarosa fructosiltransferasa y la fructano:sacarosa fructosiltransferasa, que catalizan la transferencia de unidades de fructosa desde la sacarosa a otros aceptores de fructosa, formando fructanos de cadena corta y larga que son almacenados en las vacuolas celulares (Andrade *et al.*, 2007; González-Díaz *et al.*, 2020).

2.9 Distribución de las plantas de agave

Las plantas de agave se encuentran en las regiones áridas y semiáridas de 26 estados de México (Fig. 4). El 75% de las especies de agave son endémicas de México, y esta diversidad se ha atribuido a los hábitats variados del país, la taxonomía de la planta, su tolerancia ecológica, capacidad de dispersión y la interacción con organismos polinizadores (Avendaño-Arrazate *et al.*, 2015).

Entre sus principales usos agroindustriales destaca la producción de bebidas alcohólicas y fibras textiles. Por ejemplo: el tequila que es la principal bebida alcohólica mexicana consumida en todo el mundo (Martha-Lucero, 2018 & Nava-Cruz *et al.*, 2015). También se han producido sapogeninas como subproducto de la industria henequenera (Viniestra-González, 2021).



Fig. 4 Territorio en los que se cultiva el agave (Martha-Lucero, 2018).

2.10 *Agave salmiana*

El *Agave salmiana* es una especie nativa de México, tradicionalmente conocida como maguey de pulque, maguey de quiote o maguey poblano (Cruz-Vasconcelos *et al.*, 2024; Huezcas-Garrido *et al.*, 2022). Esta planta es perenne y alcanza su etapa reproductiva sexual entre los 12 y 20 años, mientras que asexualmente produce entre 5 y 6 crías (Cruz-Vasconcelos *et al.*, 2024; García-Mendoza, 2007). Su principal aprovechamiento es como fuente de aguamiel para consumo humano y la elaboración de pulque bebida fermentada (Huezcas-Garrido *et al.*, 2022).

Esta especie se caracteriza por la gran cantidad de sus variantes y su amplia distribución en la región del Altiplano, abarcando localidades en México desde Tlaxcala hasta Coahuila. Su cultivo se desarrolla a altitudes de entre 1,200 y 2,500 metros, con precipitaciones anuales de 350 a 1,000 mm. La superficie verde total de la planta puede llegar a los 75,000 cm² (Vázquez-Díaz *et al.*, 2011). Existen dos principales sistemas de producción, el primero corresponde al 60% y es un sistema de producción intensivo con una densidad promedio de dos mil plantas por hectárea. El segundo, es el sistema de metepantles (cultivo que

combina plantación de agave y otros cultivos) con una densidad promedio de 604 plantas por hectárea (Ortega-Solano *et al.*, 2024).

Los agaves pulqueros pueden alcanzar una altura de 2 metros o más y tienen un lapso de aprovechamiento que oscila entre 10 a 15 años. Las características morfológicas de la planta están detalladas en la **Tabla 4** (Juárez *et al.*, 2014).

Tabla 4. *Características del agave pulquero (Fuente: Juárez et al., 2014)*

Parte de la planta	Características
Raíces	Son fibrosas y muy extensas, pueden alcanzar profundidades significativas en el suelo.
Tallo	Los tallos pueden variar de cortos a grandes, alcanzando hasta 10 m de largo.
Hojas o pencas	Angostas con una forma lanceolada, carnosas y cutículas gruesas, que nacen del tallo y rematan en una espina afilada y oscura. El tamaño puede alcanzar hasta los 2 m de longitud. El color es verde oscuro.
Flor	Inflorescencias paniculadas con flores hermafroditas de color amarillo verdoso y con un tamaño de 7-10 cm de largo.
Frutos	Cápsulas o bayas em forma oblonga que contiene decena de semillas pequeñas, planas y de color negro.

Según lo reportado por Silos-Espino *et al.* (2007), las hojas de agave tienen un contenido de humedad del 89%, un 5% de proteína cruda y un 3.03% de proteína disponible. Además, contienen minerales como zinc (169 mg/kg), hierro (332 mg/kg), cobre (42.8 mg/kg), boro (310 mg/kg) y selenio (0.059 mg/kg).

2.11 Subproductos del agave

Para la producción de destilados de los agaves, solo se aprovecha la piña, mientras que las hojas que representan aproximadamente el 40% del agave, son desechadas. Así

mismo, se estima que en el año 2023 se desperdiciaron alrededor de 300 mil toneladas de hojas de agave en los campos lo que lleva a problemas ambientales y socioeconómicos (Consejo Regulador del Tequila, 2024).

En cuanto al *Agave salmiana*, que se utiliza principalmente para la producción de pulque, la economía de esta bebida está en crisis debido al bajo precio que se paga a los productores por la materia prima y el pulque, así como a la preferencia por otras bebidas que han desplazado al pulque. Lamentablemente, las comunidades productoras de *A. salmiana* son zonas de bajos recursos que necesitan urgentemente encontrar alternativas para aprovechar integralmente el agave y solucionar la crisis económica. El cultivo del agave puede fomentar el desarrollo sostenible de las comunidades rurales mediante un uso integral de la planta, produciendo no solo pulque, sino también otros compuestos derivados de las hojas que actualmente no se aprovechan (Ortega-Solano *et al.*, 2024).

En la actualidad, se está explorando un nuevo enfoque para el aprovechamiento de los residuos agrícolas generados por la industria de destilados. Este enfoque busca mitigar los problemas ambientales y agregar valor a otros compuestos como la fibra, los fructanos y las saponinas (Gallardo-Martinez, 2023; Martha-Lucero, 2018).

Las fibras de hoja de agave son un subproducto valioso que puede ser aprovechado en textiles, cuerdas, sacos, tapetes, alfombras, redes de pesca, cepillos, papel, rellenos de colchones, entre otros (Morán-Velázquez, 2023).

El bagazo es la fracción sólida y orgánica que queda tras la extracción de la hoja. Su potencial radica en su uso en ensilados, ofreciendo una alternativa viable como alimento para la nutrición de los rumiantes (Delgadillo-Ruíz, 2015; Viniegra-González, 2023).

Por otro lado, el jugo de la hoja es la parte líquida y se ha encontrado que contiene polisacáridos (Montañez, 2011), especialmente los de tipo fructanos que son carbohidratos de reserva que están formados por un esqueleto de monómeros de fructosa unidos entre sí por enlaces glucosídicos β (2→1) y/o β (2→6) y contiene una molécula de glucosa en su

estructura (Seminario *et al.*, 2003). En la **Fig. 5** se observan los polímeros de alta masa molecular (GP>10), oligómeros (GP<10) y un disacárido como la inulobiosa.

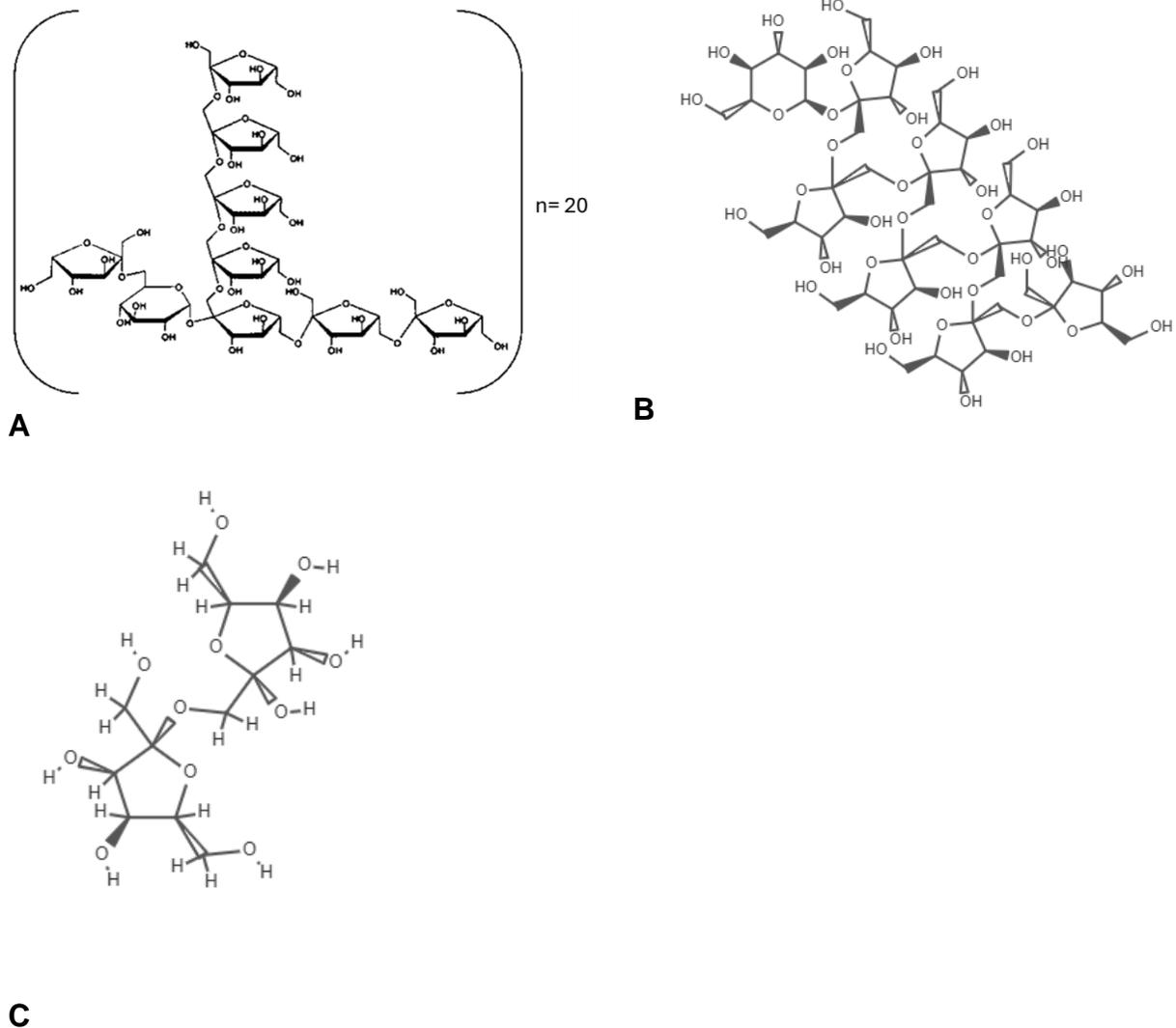


Fig. 5 Estructuras químicas de a) fructanos de agave, b) fructooligosacáridos y c) inulobiosa (Fuente: López *et al.*, 2003 y PubChem, 2024).

Por otra parte, Se ha intentado añadir valor a las hojas de agave azul mediante su uso en la producción de bioetanol, aprovechando así de manera integral el cultivo (Montañez-Soto, 2011). Otra alternativa es el uso de las hojas para la producción de fructanos para jarabes de fructosa, endulzantes y prebióticos (Alcocer, 2014).

2.12 Fructanos de agave

Los fructanos ramificados, conocidos como neofructanos poseen enlaces β -(2,1) y β -(2,1) (2,6). Estos polisacáridos están constituidos principalmente por unidades de fructosa y una unidad de glucosa. Este tipo de carbohidrato se encuentra presentes en plantas como el agave (Márquez-Aguirre *et al.*, 2013; McCleary *et al.*, 2019). El proceso de extracción de fructanos de las plantas generalmente se basa en la difusión de polisacáridos en agua caliente (Espinosa-Andrews *et al.*, 2021).

En los últimos años, el interés en los fructanos de agave ha crecido, tanto por su potencial como ingrediente en alimentos funcionales como por sus propiedades tecnológicas. La variedad de sus aplicaciones se debe a su estructura y origen (García-Villalba *et al.*, 2023). Se ha reportado que los fructanos de agave son una fuente de carbono asimilable en las fermentaciones lácticas sin necesidad de un pretratamiento de hidrólisis, empleando *Lactocaseibacillus casei* NRRL B-441 y *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* NRRL B-763. Esto representa un preámbulo para el aprovechamiento de residuos agroindustriales (Martha-Lucero, 2018).

2.13 Saponinas en los agaves

Las hojas de *Agave salmiana* contienen saponinas, metabolitos secundarios que actúan como una barrera química en el sistema de defensa de las plantas, protegiéndolas de patógenos y herbívoros. Por esta razón, se encuentran en los tejidos vegetales más vulnerables al ataque de hongos, bacterias o insectos depredadores (Young, 2014).

Desde el punto de vista químico, las saponinas son compuestos que presentan una estructura compuesta por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica formada por unidades de monosacáridos, unida por un enlace glicosídico (**Fig. 6**). Este enlace al ser

hidrolizado produce de 2 a 6 residuos de monosacáridos y una porción carbonada policíclica conocida como aglicona, denominada como sapogeninas (Martínez, 2005).

Las sapogeninas son compuestos altamente valorados en la industria farmacéutica, ya que se utilizan en la síntesis de hormonas sexuales, corticosteroides y vitamina (Kaur *et al.*, 2024).

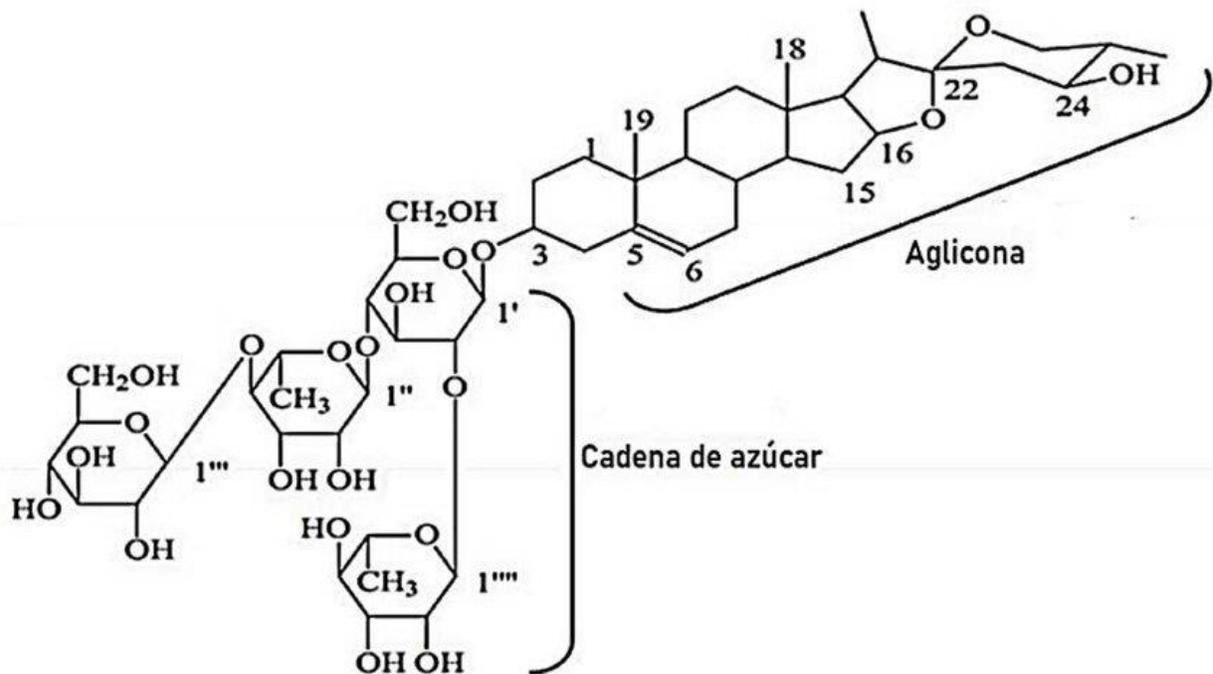


Fig. 6 Estructura química de saponinas (Fuente: Aziz *et al.*, 2019)

3. Hipótesis

Las BAL aisladas de agave lograrán formar biopelículas que incrementarán la producción de AcL en comparación con las células planctónicas.

El jugo de agave contiene los elementos de sustratos y nutrientes suficientes para transformar, en una elevada proporción, dichos sustratos en AcL.

4. Justificación

El AcL es un precursor esencial para la fabricación de PLA, uno de los bioplásticos más demandados a nivel mundial debido a su capacidad para reemplazar la mayoría de los polímeros empleados en la industria alimentaria, ya sea solo o combinado con otros biopolímeros.

En países como Tailandia y Estados Unidos, la producción de AcL ha avanzado mediante el uso de excedentes de caña de azúcar y maíz, respectivamente. Sin embargo, México no dispone de estos excedentes, lo que hace necesario explorar alternativas sostenibles, como el aprovechamiento de la biomasa residual. En este caso, las hojas de agave generadas por las industrias productoras de tequila, mezcal y pulque representan una opción viable. Según Arzate y Mejía (2011), estas industrias generan grandes volúmenes de hojas subutilizadas, y existe interés en desarrollar tecnologías que permitan su aprovechamiento integral.

Particularmente, la industria del tequila ofrece un caso destacado por su relevancia económica, con una producción anual cercana a 600 millones de litros, un valor estimado en casi 500 millones de dólares y un crecimiento del 3% anual (Consejo Regulador del Tequila, 2024; Data México, 2024). No obstante, los resultados de este estudio también podrían beneficiar a la industria del pulque, que produce 100 millones de litros anuales en 10 mil hectáreas, principalmente en Hidalgo y Tlaxcala. En este contexto, el uso de derivados de *Agave salmiana*, la principal especie utilizada para la producción de pulque es de interés para la implementación de procesos de reutilización de residuos para la

producción de AcL, sustituyendo fuentes de carbono que no son rentables para nuestro país

Así mismo, la elección del jugo de hojas de agave se sustenta en estudios previos, como el de Martha-Lucero (2018), que demostró la viabilidad de fermentar directamente los fructanos comerciales de agave con *L. casei* y *L. bulgaricus* en medios definidos, destacando la necesidad de desarrollar un sustrato más económico que el medio MRS tradicional. Adicionalmente, los estudios de Pinos-Rodríguez *et al.* (2008) demostraron que la fermentación espontánea de las hojas de *A. salmiana* genera altos rendimientos de AcL, lo que sugiere que el jugo de estas hojas contiene los nutrientes necesarios para una fermentación eficiente.

Asimismo, Gallardo-Martínez *et al.* (2024) identificaron BAL endófitas en agave capaces de transformar fructanos en AcL con una eficiencia del 70%. Estos hallazgos respaldan la combinación del uso del jugo de agave, las BAL aisladas de esta planta y la fermentación en biopelículas como una estrategia prometedora para aumentar la productividad de las fermentaciones lácticas.

5. Planteamiento del problema

¿Son las BAL aisladas de agave capaces de formar biopelículas utilizando fructanos de agave como fuente principal de carbono?

Como segunda parte, ¿Será el jugo de la hoja de agave un medio de cultivo idóneo para las fermentaciones lácticas y la formación de biopelículas, sin la necesidad de añadir nutrientes externos?

6. Objetivo

6.1 Objetivo general

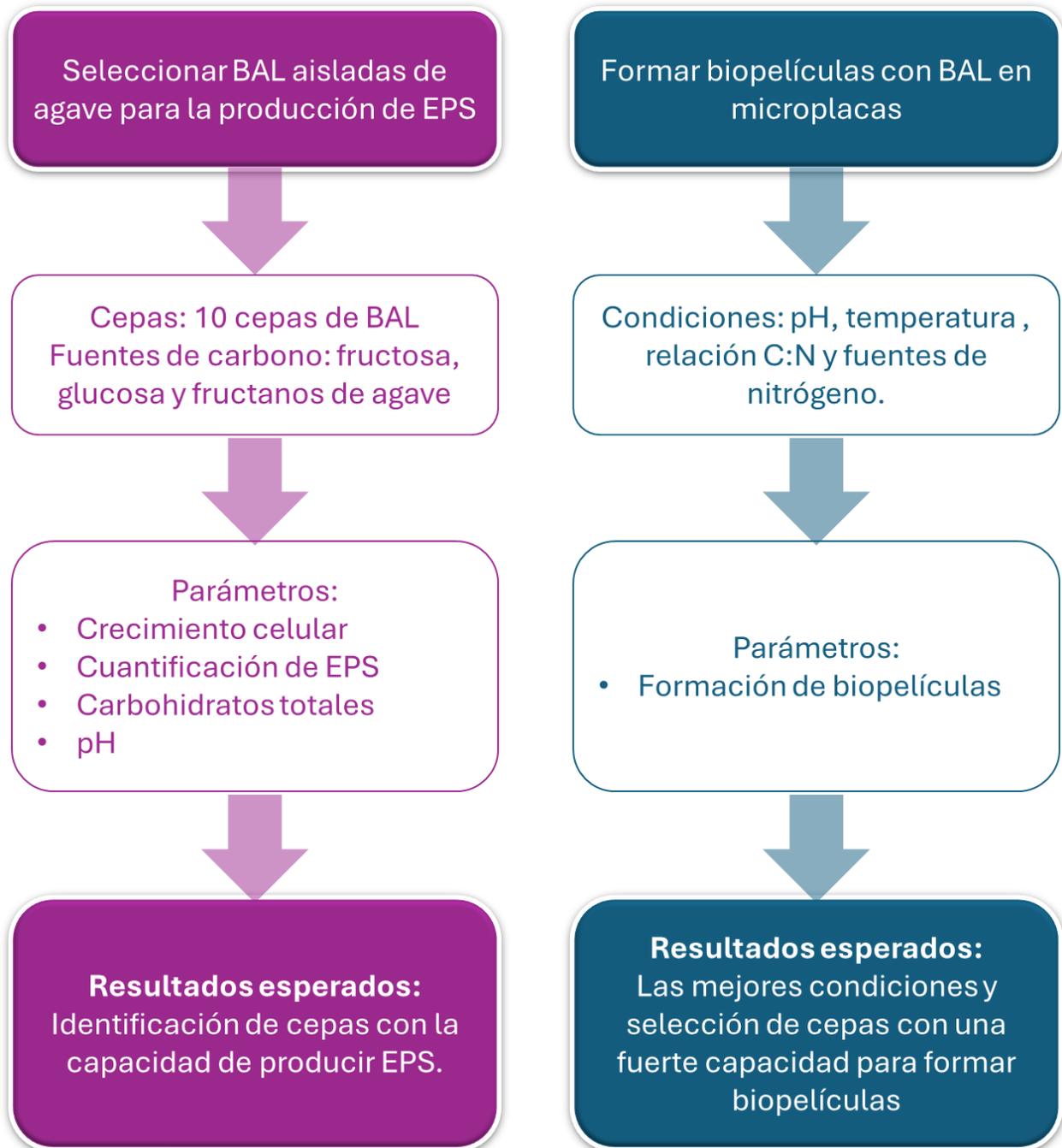


Evaluar las condiciones ideales para la formación de biopelículas de BAL aisladas del agave, con el propósito de utilizarlas en la conversión eficiente de fructanos de agave en AcL.

6.2 Objetivos particulares

- Seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de agave para la producción de exopolisacáridos EPS utilizando fructanos comerciales de agave, fructosa y glucosa como fuentes de carbono.
- Analizar la formación de biopelículas en soportes bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y distintas relaciones carbono: nitrógeno (C: N).
- Emplear biopelículas para la producción de AcL mediante fermentaciones líquidas con ciclos repetitivos.
- Evaluar la eficiencia en la producción de AcL empleando el jugo de la hoja de agave como sustrato con la cepa *Lactocaseibacillus paracasei* DG8.
- Examinar la formación de biopelículas utilizando el jugo de la hoja de agave como única fuente de nutrientes, sin la adición de compuestos externos.

7. Plan de trabajo



Evaluar la producción de AcL utilizando biopelículas en perlas de polipropileno.



Condiciones: planctónicas y biopelículas



Parámetros:

- Microscopía electrónica
- AcL
- Carbohidratos



Resultados esperados:
Aumento en la productividad de AcL con biopelículas de BAL

Analizar el jugo de agave como una alternativa de medio de cultivo para las fermentaciones lácticas



Condiciones: fracciones del jugo de la hoja de agave



Parámetros:

- Carbohidratos totales
- Proteínas
- Cinéticas de crecimiento
- Cinéticas de producción de AcL
- Formación de biopelículas



Resultados esperados:
Aprovechamiento del jugo de agave como medio de cultivo en fermentaciones lácticas

8. Materiales y métodos

8.1 Microorganismos

Se emplearon las BAL reportadas por Gallardo-Martínez (2024) descritas en la Tabla 5 y un testigo positivo *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772, de la colección Nacional de bacterias alimentarias de Escocia.

Tabla 5. *Microorganismos utilizados en la investigación*

Código	Bacteria	Aisladas
DG1	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG2	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG3	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG4	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG5	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG6	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG7	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Aguamiel
DG8	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>	Hojas de Agave
DG9	<i>Enterococcus faecium</i>	metzal ^a

^a Metzal es definido como material raspado de la cabeza del agave (Peralta-García *et al.* 2020)

8.2 Medio de cultivo

Para las fermentaciones se utilizaron los componentes reportados por De Man *et al.*, 1960 las cuales fueron: fuente de carbono (2% w/v), extracto de carne (1% w/v), peptona (1 % w/v), extracto de levadura (0.5% w/v), acetato de sodio (0.5% w/v), fosfato de potasio (0.2% w/v), citrato de amonio (0.2% w/v), sulfato de magnesio (0.020% w/v), sulfato de

manganeso (0.005 % w/v), agar (1% w/v), tween 80 (0.1% v/v).

Con el objeto de evaluar otras condiciones, se hicieron modificaciones en fuente de carbono.

8.3 Fuente de carbono

Las fermentaciones se realizaron utilizando fructosa y glucosa de Sigma Aldrich® con una pureza del 99%, así como fructanos comerciales de agave de Nutri-Agave®. Las fuentes de carbono sustituidas se añadieron en la misma proporción que la fuente de carbono original del medio comercial.

8.4 Determinación de crecimiento

Se utilizó la técnica de determinación a través de la medición de la absorbancia a 600 nm reportada por Escamilla-Lozano *et al.*, (2015). La biomasa (mg/mL) se calculó con la siguiente ecuación;

$$\text{Biomasa (mg/mL)} = (y - 0.0193) / 0.2424$$

Donde:

y= absorbancia

8.5 Determinación de pH

La cuantificación de pH se realizó empleando un potenciómetro (Thermo Scientific) modelo Orion 5 Star Plus.

8.6 Determinación de carbohidratos totales

La cuantificación de azúcares totales se realizó siguiendo el método de Dubois (1956) con algunas modificaciones. En un tubo de ensayo de 15.30 x 150 x 0.80 mm, se añadieron 1 mL de muestra y 1 mL de fenol al 50% diluido en ácido sulfúrico. El fenol-ácido sulfúrico se



añadió cuidadosamente por las paredes del tubo en un baño de agua con hielo. La mezcla se llevó a ebullición durante 10 minutos, se enfrió en un baño de agua a 25 °C y se midió la absorbancia a 480 nm (Thermo Electron Corporation, Génesys 10 UV). La concentración de azúcares totales se determinó utilizando la ecuación obtenida de una curva de calibración de fructosa (0 a 0.5 g/L):

$$x = (y + 0.0543) / 3.9582$$

Dónde:

y = absorbancia.

8.7 Actividad enzimática con fructosidasas

La actividad enzimática se midió a través del aumento de carbohidratos reductores a partir de una solución de fructanos comerciales de agave, siguiendo el método descrito por Tovar-Castro et al. (2008) con algunas modificaciones. Para esta metodología, fue necesario preparar los siguientes reactivos:

Reactivo 1:

Preparación: Se mezclaron 25 mL de solución A y 1 mL de solución B.

Solución A: En 800 mL de agua destilada, se disolvieron 25 g de carbonato de sodio anhidro, 25 g de tartrato de sodio y potasio, 20 g de bicarbonato de sodio y 200 g de sulfato de sodio. Finalmente, la solución se aforó a 1000 mL.

Solución B: En 200 mL de agua destilada, se añadieron 4 gotas de ácido sulfúrico y se disolvieron 30 g de sulfato de cobre.

Reactivo 2:

Preparación: Se mezclaron las soluciones C y D y se aforaron a 500 mL. Posteriormente, se calentó a 55 °C durante 30 minutos.



Solución C: En 450 mL de agua destilada, se disolvieron 21 mL de ácido sulfúrico y 25 g de molibdato de amonio.

Solución D: En 25 mL de agua destilada, se disolvieron 3 g de arseniato de sodio heptahidratado.

La reacción enzimática consistió en añadir 1 mL de sobrenadante (enzimas extracelulares producidas por las BAL) a 9 mL de una solución al 0.1% de fructanos comerciales de agave disueltos en un buffer de fosfatos con pH 7. La mezcla se incubó a 37 °C y se tomaron muestras a los 1, 3, 5, 7 y 10 minutos, deteniendo la reacción en cada intervalo con un choque térmico y la adición de 1 mL del reactivo 1.

Para cuantificar los carbohidratos reductores liberados, las muestras de cada intervalo de tiempo, a las que se les añadió el reactivo 1, se incubaron durante 20 minutos en un baño de agua hirviendo. Luego, se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 1 mL del reactivo 2 y se agitaron vigorosamente. Finalmente, se añadieron 17 mL de agua destilada, se agitó la mezcla y se midió la absorbancia a 520 nm.

Los datos se correlacionaron con una curva patrón que utilizó fructosa como estándar (0 a 200 µg/mL), con la ecuación:

$$x = (y + 0.0398) / 0.0039$$

dónde y= absorbancia

8.8 Determinación de EPS

La cuantificación de EPS se realizó de acuerdo con Carrero-Puentes *et al.*, (2021). La metodología consiste en adicionar 3 mL de la muestra y 0.5 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 80%, posteriormente se centrifuga a 10,000 RPM durante 30 min a 4 °C, se recupera el sobrenadante y se le agrega 1 mL de etanol al 96% y la mezcla se dejó reposar durante 20 min a 4 °C. Después del tiempo de reposo, se midió la absorbancia a 720 nm y

se correlacionó la concentración de EPS en la curva estándar de dextrano (0 a 1 mg/mL) dada por la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración EPS (mg/mL)} = (y - 0.1234) / 0.5767$$

Donde:

y= absorbancia.

8.9 Auto agregación

La determinación de auto agregación de las BAL se realizó como lo reportó Maldonado *et al.*, (2009). Se utilizó la biomasa recuperada de la fermentación con fructanos comerciales de agave de 24 h. La biomasa fue previamente lavada y suspendida con SBF (solución buffer de fosfatos 1 M pH 7.4) y se incubó durante 2 h a 37 °C, sin agitación. Finalmente se midió la absorbancia a 600 nm.

La agregación se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Auto agregación} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Dónde: A₀ y A son la absorbancia antes y después de la incubación, respectivamente.

Para definir las características de auto agregación, se dividieron en 3 categorías: alta (71-100%), media (36-70%) y baja (0-35%).

8.10 Hidrofobicidad

La determinación de la hidrofobicidad se realizó por el método de adhesión microbiana a hidrocarburos como lo reportó Ocana *et al.*, (1999). Se agitó la mezcla de 2 mL de muestra con 0.4 mL de disolvente orgánico durante 2 min, posteriormente se dejó reposar durante 20 min. Se eliminó la fase acuosa inferior y se midió la DO a 600 nm.

Cálculo:



$$\% \text{ Hidrofobicidad} = [(A_0 - A) / A_0] \times 100$$

Donde:

A₀= Absorbancia antes de la extracción con solventes

A= después de la extracción con solventes.

Para definir las características de hidrofobicidad, se dividieron en 3 categorías: alta (71-100%), media (36-70%) y baja (0-35%).

8.11 Formación de biopelícula en microplaca

Se utilizó el método de microplaca de 96 pocillos (Kawarai *et al.*, 2007), que consistió en realizar una fermentación en microplaca durante 72 horas a 37 °C, utilizando un pre-inóculo del 10% en 200 µL de medio de cultivo.

Posteriormente, se evaluó la capacidad de formación de la biopelícula, eliminando las células adheridas a la microplaca mediante el uso de solución salina de fosfatos (SBF) para el lavado de las biopelículas, realizándolo tres veces. Luego, se cuantificaron las bacterias adheridas a la biopelícula utilizando cristal violeta al 1%, dejándolo reposar durante 30 minutos. El exceso de colorante se enjuagó con agua destilada. Después de que las biopelículas se secaron al aire durante 30 minutos, el tinte unido a las células adherentes se extrajo con 200 µL de una solución de etanol-acetona (80:20). Finalmente, se midió la absorbancia de la solución a 565 nm.

De acuerdo con los rangos de densidad óptica (DO), la formación de biopelículas se puede clasificar de la siguiente manera:

Baja: 0 a 0.499

Media: 0.5 a 1.499

Alta: >1.5



8.12 Parámetros evaluados en la formación de biopelículas

Para la formación de biopelículas, se midieron de forma independiente los factores descritos en la Tabla 6, utilizando como referencia el medio de cultivo MRS descrito en la sección 8.2. Además, en la mayoría de los casos, se utilizó la cepa *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 DG10 como testigo, debido a que esta reportada como productora de EPS y es la más utilizada para la producción de AcL a nivel industrial.

Tabla 6. Factores evaluados en la formación de biopelículas

Factores evaluados	Medio de cultivo	pH	Tiempo	BAL analizadas	Testigo
Fuente de carbono: -Glucosa (20 g/L) -Fructosa (20 g/L) -Fructanos comerciales de agave (20 g/L)	Componentes de medio MRS sin fuente de carbono	6.5	3 días	<i>L. paracasei</i> de la DG1 a DG8 <i>E. faecium</i> DG9	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> NCFB 2772 DG10
pH inicial : 5, 5.5, 6 y 6.5	Componentes de medio MRS con fructanos comerciales de agave (20 g/L)	No aplica	3 días	<i>L. paracasei</i> de la DG1 a DG8 <i>E. faecium</i> DG9	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> NCFB 2772 DG10
Tiempo de fermentación	Componentes de medio MRS con fructanos de agave (20 g/L)	6.5	No aplica	<i>L. paracasei</i>	<i>L. delbrueckii subsp. bulgaricus</i>

-3 días				de la DG1 a DG8	NCFB 2772 DG10
-5 días				<i>E. faecium</i> DG9	
Distintas concentraciones de fructanos: 0,10, 20, 30 g/L	Componentes de medio MRS con fructanos comerciales de agave	6.5	3 días	<i>L. paracasei</i> de la DG1 a DG8 <i>E. faecium</i> DG9	<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> NCFB 2772 DG10
Las fuentes de nitrógeno: -Base de nitrógeno de levadura sin aminoácidos (YNB). -Extracto de levadura -Tryptona de soya -Sulfato de amonio -Peptona	Se evaluaron dos fuentes de carbono (glucosa y fructanos comerciales de agave) utilizando el medio de cultivo MRS sin fuente de nitrógeno. Se mantuvo una relación C:N= 5	6.5	3 días	<i>L. paracasei</i> DG8	Se utilizó como testigo una combinación de extracto de levadura, extracto de carne y peptona.

8.13 Formación de biopelículas en perlas de polipropileno

De acuerdo con los resultados obtenidos previamente en la formación de biopelículas en microplacas se seleccionaron las cepas: DG8, DG9 y DG10. La fermentación se realizó en

botellas serológicas de 30 mL (PYREX, EE. UU.) con 5 mL de medio, 5 g de perlas de polipropileno y 1 % de inóculo con una concentración de 8 mg/mL de biomasa, durante 5 días a 37 °C.

8.14 Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Las biopelículas en las perlas de polipropileno se analizaron por SEM de acuerdo con lo reportado por Lluís-Arroyo *et al.* (2014) quienes fijaron con glutaraldehído 3.5% con rojo de rutenio al 0.8 % durante 24 h, posteriormente se eliminó el fijador con lavados de SBF y se realizó la post fijación durante 2 h con tetraóxido osmio al 2 %. Después se realizó la deshidratación gradual llevando a las muestras en etanol del 30 al 100%. Posteriormente las muestras fueron secadas por punto crítico con CO₂ y finalmente las muestras fueron montadas en porta-muestras de aluminio empleando carbono coloidal y fueron cubiertas con cuatro capas de oro para ser observadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) en un microscopio JEOL JSM-5900LV a 15 a 20 kV.

8.15 Determinación de AcL

La cuantificación de AcL se realizó mediante lo descrito por Valdés-Velasco *et al.*, 2022 utilizando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, Perkin-Elmer) equipado con una columna de exclusión iónica Biorad, (Aminex HPX-87H; Bio-Rad Laboratories, CA, EE. UU.) de un tamaño de 300 mm de longitud y 7.8 mm de diámetro, una bomba LC 250, un detector de índice de refracción LC-30 (Perkin Elmer, Waltham, EE. UU.) y un horno (Perkin Elmer, Waltham, EE. UU.). Como medio de elución isocrática se usó ácido sulfúrico 5 Mm previamente desgasificada a una velocidad de flujo de 0.6 mL / min a 50°C.

8.16 Preparación del jugo de agave

Las hojas de *Agave salmiana* eran provenientes de una finca en Coatepec (Iztapaluca, Mex.). Se obtuvieron de plantas maduras que habían terminado la producción de aguamiel. Las hojas se fraccionaron en 2 partes al realizarse un corte transversal y longitudinal, posteriormente la fracción de la hoja paso por una máquina desfibradora (DESPESA, Mex.)



en donde se separó el jugo, la pulpa y la fibra. En los experimentos de este trabajo se aprovechó el jugo, el cual paso a una siguiente etapa de tratamiento que consistió en centrifugación a 10,000 RPM durante 30 min, seguido de la filtración por vacío.

El jugo de agave se pasteurizó a 85 °C durante 15 min, posteriormente se llevó a choque térmico en un baño de hielo y se almacenó a 4°C para posteriores análisis.

8.17 Eliminación de saponinas en el jugo de la hoja de agave

Las saponinas fueron removidas de manera mecánica, utilizando un embudo de separación, dónde se añadió el jugo y se agitó durante 60 s formando espuma la cual fue removida, lo anterior se repitió durante 10 veces para retirar la mayor cantidad de espuma.

Posteriormente se cuantificaron las saponinas según el método de Baccou *et al.* (1977), descrito a continuación.

8.18 Determinación de distribución de carbohidratos por HPLC-SEC

Para determinar la distribución y tamaño de los carbohidratos presentes en el jugo de hoja de agave se empleó un sistema de cromatografía de HPLC 1220 Infinity LC ® acoplado a un detector de índice de refracción (Agilent, Alpharetta G) con una columna Ultrahydrogel DP® con una detección de moléculas de 100-5000 Da, como fase móvil se utilizó agua acidificada con HCl a un pH de 5.4 a un flujo de 0.3 mL/ min a una temperatura de 50 ° C y para la cuantificación se empleó el método evolutivo simplex reportado por Moreno-Villet *et al.*, 2017.

8.19 Determinación de glucosa

La cuantificación de glucosa se realizó utilizando la técnica de Miller *et al.* (1959), que mide la concentración de azúcares reductores. Se mezclaron 3 mL de muestra con 3 mL de DNS, se llevaron a ebullición durante 5 minutos y se enfriaron con agua corriente. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm. Se utilizó una solución madre de glucosa en una curva patrón de 0 a 1 g/L, y los datos se correlacionaron con la ecuación obtenida:

$$x = (y - 0.0721) / 1.1596$$

dónde y= absorbancia.

8.20 Determinación de fructosa, sacarosa y fructanos GP = 22.7

Se empleó un sistema HPLC (Agilent, Alpharetta, EE. UU.) con un detector de índice de refracción (Agilent, Alpharetta, EE. UU.) y una columna cromatográfica de intercambio iónico Aminex HPX-87C (7.8 mm x 300 mm, Bio-Rad, Hercules, EE. UU.). La fase móvil consistió en agua destilada con un flujo de 0.55 mL/min. Se inyectaron 20 µL de muestra y la temperatura de la columna se mantuvo a 68 °C. Los datos obtenidos se compararon con curvas de calibración de una mezcla de glucosa, fructosa, sacarosa (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, EE. UU.) e inulina de achicoria (Raftiline HP®, BENEIO Inc., Parsippany-Troy Hills, EE. UU.) en concentraciones de 0 a 20 g/L (Lorenzo-Santiago *et al.*, 2023).

8.21 Fermentaciones en jugo de agave

Se empleó la cepa *Lactocaseibacillus paracasei* DG8, que mostró los mejores resultados en la formación de biopelículas. Como medio de fermentación, se utilizó jugo de agave diluido en agua hasta alcanzar una concentración de carbohidratos de 20 g/L (medido previamente según Dubois, 1956). La fermentación se llevó a cabo durante 5 días, tomando muestras cada 24 horas para cuantificar el crecimiento celular, el consumo de sustrato y la producción de AcL.

8.22 Determinación de proteínas del jugo de la hoja de agave

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando el método de Biuret descrito por Doumas (1975). La técnica consistió en mezclar 5 mL de reactivo Biuret con 1 mL de muestra. Posteriormente, la mezcla se agitó y se incubó durante 30 minutos a 25 °C. Finalmente, se midió la absorbancia a 540 nm y los datos se correlacionaron con la curva patrón, utilizando albúmina como estándar (0 a 1 g/L), con la ecuación obtenida:

$$x = y + 0.0027/0.0437$$



Dónde:

y= absorbancia.

Para la preparación del reactivo, se disolvieron 3 g de sulfato de cobre, 9 g de tartrato de sodio y potasio, y 5 g de yoduro de potasio en 500 mL de agua destilada. Luego, se añadió una solución de NaOH al 24%. Finalmente, se ajustó el volumen a 1000 mL

8.23 Extracción de saponinas del jugo de la hoja de agave

Para extraer las saponinas, se mezcló jugo de agave con butanol en una proporción 1:1 en frascos de vidrio herméticos. La solución se agitó a temperatura ambiente durante 12 horas. Luego, se recolectó la mezcla y se vertió en un embudo de separación para obtener la fase orgánica, donde se encontraban las saponinas (Baccou *et al.*, 1977).

8.24 Cuantificación de saponinas

La cuantificación de saponinas en el jugo de la hoja de agave se realizó con el extracto obtenido del paso anterior. Se elaboraron las soluciones para llevar a cabo el análisis de acuerdo con lo reportado por Baccou *et al.* (1977). Para la solución A, se mezclaron 0.05 mL de *p*-anisaldehído con 99.5 mL de acetato de etilo. La solución B consistió en una mezcla de 5 mL de acetato de etilo con 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, a cada muestra se le añadieron 500 µL de solución A y 500 µL de solución B. Las muestras se colocaron en un baño húmedo a 60°C durante 20 minutos. Posteriormente, se dejaron enfriar en agua a temperatura ambiente durante 10 minutos y se midió su absorbancia a 430 nm, los datos fueron interpolados en la ecuación dada por la curva estándar de diosgenina (0 a 0.5 mg/L):

$$x = (y + 0.2374) / 0.0881$$

Dónde: y= absorbancia

8.25 Determinación cualitativa de saponinas



La determinación cualitativa se realizó mediante el método de Salkowski que fue reportado por Mir *et al.*, (2016), la técnica consiste en la mezcla de 5 mL de cloroformo y 0.5 mL de la muestra. Posteriormente se le adicionaron 3 mL de ácido sulfúrico. Los esteroides reaccionan con el ácido sulfúrico, produciendo un cambio de color que va entre rojo a naranja.

8.26 Análisis estadístico

Los datos se presentaron como medias de tres réplicas, acompañadas del error estándar de cada valor medio. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando Statgraphics Plus 5.1 (Nueva Jersey, EE. UU.). Se realizaron análisis de varianza ($\alpha = 0.01$) y pruebas de Tukey para identificar diferencias significativas entre los experimentos.

9. Resultados y discusión

9.1 Crecimiento microbiano con distintas fuentes de carbono

La **Fig. 7** muestra el crecimiento de las BAL aisladas del agave utilizando diferentes fuentes de carbono. Todas las cepas lograron metabolizar fructosa, fructanos y glucosa, siendo esta última la fuente que más favoreció el crecimiento, destacando *Lactocaseibacillus paracasei* DG8 (58.7 ± 3.078 mg/mL). En contraste, la cepa que mostró mayor crecimiento en fructosa fue *L. paracasei* DG5 (30.551 ± 0.5 mg/mL). En cuanto al uso de fructanos de agave, no se observaron diferencias significativas entre *L. paracasei* DG2 (20.35 ± 0.5 mg/mL) y *L. paracasei* DG8 (19.12 ± 2.1 mg/mL).

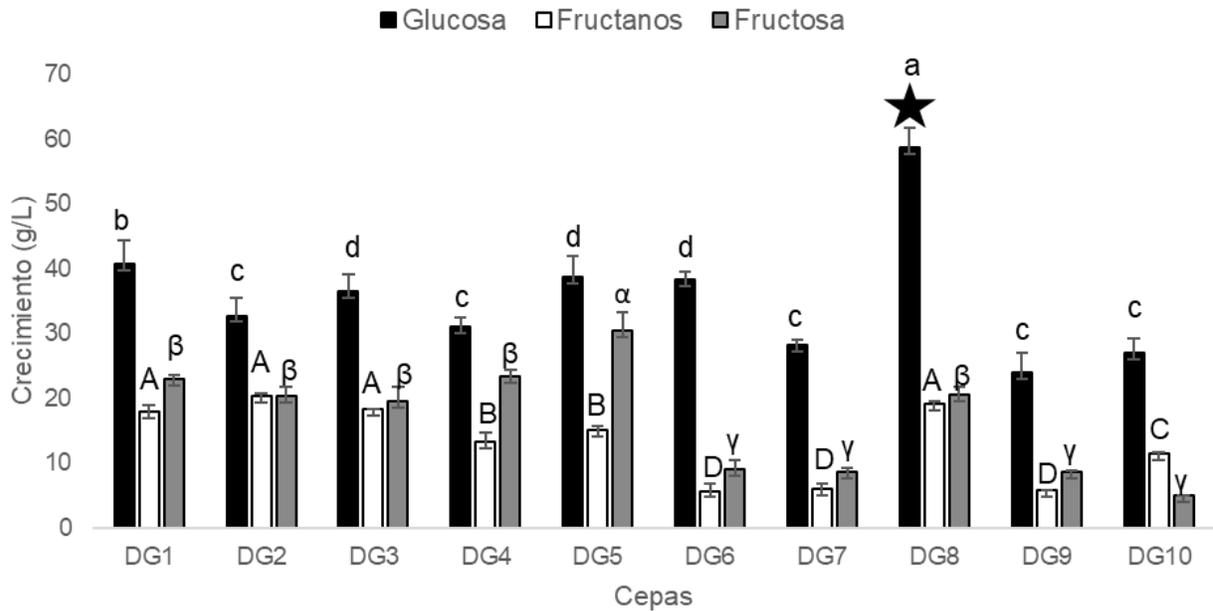


Fig. 7 Crecimiento de BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* empleando diferentes fuentes de carbono. Las letras indican las diferencias significativas por cepa en cada una de las fuentes de carbono. Las letras minúsculas representan los grupos con glucosa, las mayúsculas con fructanos de agave comercial y las griegas con fructosa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

El crecimiento de BAL en fructanos se reportó por Ramírez-Pérez *et al.* (2022) los autores determinaron que varias especies de *Lactobacillus* tienen la capacidad de aprovechar los fructanos de agave como fuente de carbono, debido a la producción y liberación de β -fructosidasas. Por su parte, Petrut *et al.* (2019) reportaron que existen diferencias entre los requerimientos de la fuente de carbono dependiendo género y especie de las BAL. Por ejemplo, el género de *Lactobacillus* (actualmente *Lacticaseibacillus*) tuvo mayor crecimiento lo que coincide con los resultados obtenidos.

Por otro lado, *Enterococcus faecium* FFb CMGB L-18 no mostró diferencia significativa entre el uso de glucosa, fructosa y sacarosa. El crecimiento de esta bacteria utilizando carbohidratos como sacarosa, es atribuido a fructosidasas que favorecen la hidrólisis de enlaces de fructosa unidas por enlaces β -(2 \rightarrow 1) fructosil-fructosa. Estas enzimas también

están reportadas en la hidrólisis de los fructanos por BAL (Jo *et al.* 2021).

Asimismo, Khosravi *et al.* (2018) analizaron que la cepa de *E. faecium* DSM 3530 creció mejor en inulina de achicoria ($\log \text{UCF mL}^{-1} = 10.5$) que en glucosa ($\log \text{UCF mL}^{-1} = 8.5$). Este resultado no coincide con lo obtenido para la cepa de este género evaluada en la tesis, lo cual puede justificarse debido a que los fructanos de agave son distintos a los de inulina en términos de estructura y absorción. Los agaves son polisacáridos ramificados que son absorbidos intracelularmente, lo que implica que las células los toman directamente para su metabolismo. En contraste, la inulina tiene una estructura lineal que se descompone en disacáridos o monosacáridos y se degrada extracelularmente antes de ser absorbida (Ayala-Monter *et al.*, 2018).

Los resultados obtenidos son importantes porque actualmente, la fuente de carbono que se emplea para el crecimiento de BAL es la glucosa proveniente del maíz y esto es una limitante en México ya que dicho grano es parte de la canasta básica de la población, causando un problema de disponibilidad del recurso al competir con el sector alimentario. Por lo tanto, es necesario analizar otras fuentes de carbono, como los fructanos presentes en el agave, una planta ampliamente distribuida en el país que ofrece una alternativa sustentable para las fermentaciones lácticas (Verma & Subudhi, 2021; Ruiz-Serrano *et al.*, 2022).

9.2 Determinación de pH

En la **Fig. 8** se observa el pH final en las tres diferentes fuentes de carbono (glucosa, fructanos y fructosa). En los resultados se encontró diferencia entre las tres fuentes evaluadas. Con glucosa (3.5 ± 0.02 a 4 ± 0.01) hubo una mayor disminución de pH en comparación con fructanos y fructosa (4 ± 0.01 a 4.5 ± 0.02). Estos hallazgos son consistentes con los reportados por Castro-Zavala *et al.* (2015), quienes indicaron que el pH disminuyó después de 24 horas de fermentación con *L. acidophilus* SACCO LA3 utilizando fructanos de agave.

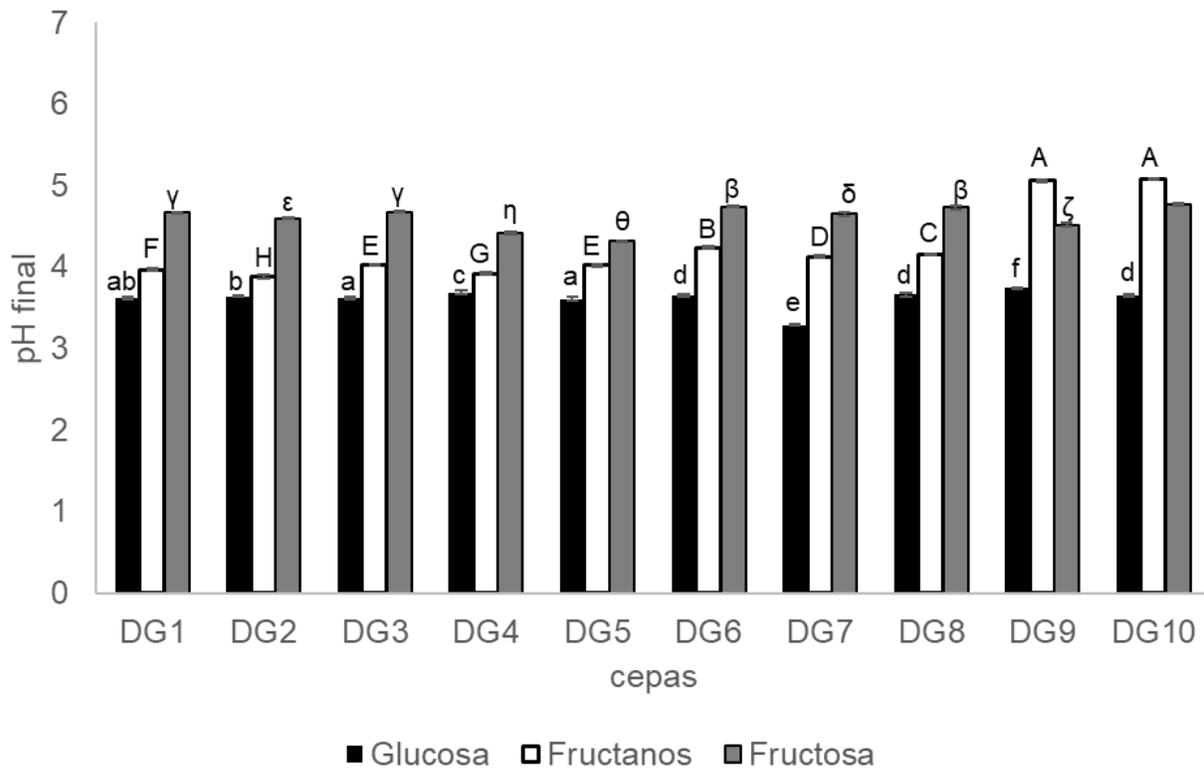


Fig. 8 pH final en las fermentaciones lácticas de las BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* con distintas fuentes de carbono: glucosa, fructanos y fructosa. Las letras indican las diferencias significativas por cepa en cada una de las fuentes de carbono. Las letras minúsculas representan los grupos con glucosa, las mayúsculas con fructanos de agave comerciales y las griegas con fructosa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero et al., 2023).

La disminución del pH se relaciona con la transformación de los carbohidratos en AcL, entre mayor crecimiento microbiano hay mayor consumo de sustrato, por lo tanto, se produce más AcL (Huertas, 2010). Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en la determinación del crecimiento (**Fig. 7**) donde con glucosa hubo un mayor crecimiento y fue donde disminuyó más el pH (**Fig. 8**).

Las BAL son ácido tolerantes y a diferencia de otros microorganismos pueden crecer en pH menores de 5, sin embargo, a pH 3.8 algunas BAL pueden perder viabilidad e inhibirse

(Vera-Peña & Rodríguez-Rodríguez, 2020). A un pH de 3.86, el AcL se disocia parcialmente, predominando su forma protonada, la cual tiene una mayor afinidad por las membranas celulares. Esto provoca un aumento de protones en el interior celular. Al superar la capacidad amortiguadora del citoplasma, los protones son expulsados al exterior mediante una bomba de protones, lo que reduce las reservas energéticas de la célula. Cuando estas reservas se agotan, la bomba de protones se detiene, lo que provoca una disminución del pH interno. Esto causa la desnaturalización de las proteínas y la desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, afectando su viabilidad (Yun *et al.*, 2003).

9.3 Crecimiento específico

La **Fig. 9** presenta los rendimientos de biomasa en función del sustrato consumido de las nueve cepas de BAL aisladas de agave, junto con una cepa testigo (*Lactobacillus delbrueckii* NCFB 2772 DG10) que ha sido reportada en el consumo de fructanos de agave y productora de EPS con glucosa. De acuerdo con los resultados, no existe diferencia significativa entre fructanos y fructosa ($p < 0.01$). Sin embargo, la glucosa promovió un mayor crecimiento específico en todas las cepas, excepto en *Lacticaseibacillus paracasei* DG2 (0.97 ± 0.01), que mostró su mejor crecimiento con fructanos de agave. En cuanto a fructosa, la cepa con mayor rendimiento fue *L. paracasei* DG5 (0.91 ± 0.02), seguida por *L. paracasei* DG1 (0.76 ± 0.01) y *L. paracasei* DG4 (0.78 ± 0.02), las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0.01$).

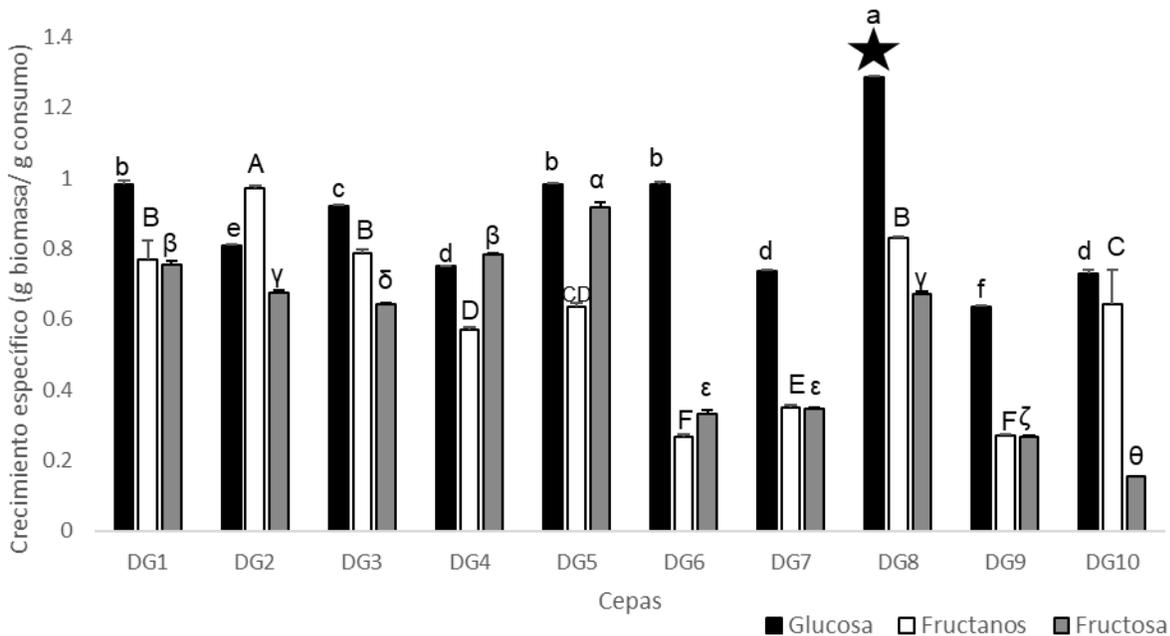


Fig. 9 Crecimiento específico de las BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* con distintas fuentes de carbono: glucosa, fructanos y fructosa. Biomasa inicial 8 g/L y carbohidrato inicial 20 g/L. Las letras minúsculas representan los grupos con glucosa, las mayúsculas con fructanos de agave y las griegas con fructosa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

En resumen, el crecimiento de las BAL en general fue mejor con glucosa como fuente de energía en comparación a los otros dos carbohidratos, lo cual fue reportado por Mousavi *et al.* (2011) y García *et al.* (2007), dónde la glucosa resultó una muy buena fuente de carbono. El metabolismo de los carbohidratos por BAL varía según los géneros, el sustrato e incluso el tiempo de fermentación.

Según los resultados obtenidos, los fructanos de agave comerciales representan una excelente opción para el crecimiento específico de ciertas BAL. Estos fructanos, que son polímeros de fructosa con una estructura ramificada, presentan un bajo grado de polimerización, lo que les confiere una mayor solubilidad y facilita su degradación y aprovechamiento. Por esta razón, los fructanos de agave son una fuente de energía superior para las BAL en comparación con otros fructanos lineales, como la inulina de

achicoria, que tienen un mayor grado de polimerización (Ayala-Monter *et al.*, 2018; Martha-Lucero, 2018).

9.4 Actividad enzimática con fructanos de agave

En el medio con fructanos de agave como fuente de carbono, se evaluó la actividad de fructosidasas en todas las cepas (**Fig. 10**). Los mejores resultados se obtuvieron con *Lacticaseibacillus paracasei* DG3 (4.79 ± 0.2) y *L. paracasei* OM967272 DG8 (3.33 ± 0.15), mientras que *Enterococcus faecium* DG9 (0.76 ± 0.05) presentó una menor actividad enzimática, lo que resultó en una menor producción de enzimas.

Lo anterior se relaciona con lo reportado por Makras *et al.* (2005) quienes han atribuido la producción de β -fructosidasa para el aprovechamiento de fructanos en *L. paracasei* subsp. *paracasei* 8700.

En contraste, en los medios de cultivo que contenían fructosa como fuente de carbono, ninguna de las cepas mostró producción de fructosidasas. Este comportamiento es consistente con el modelo de represión catabólica, donde la presencia del producto (en este caso, la fructosa) inhibe la síntesis de las enzimas fructosidasas (Muscariello *et al.*, 2001).

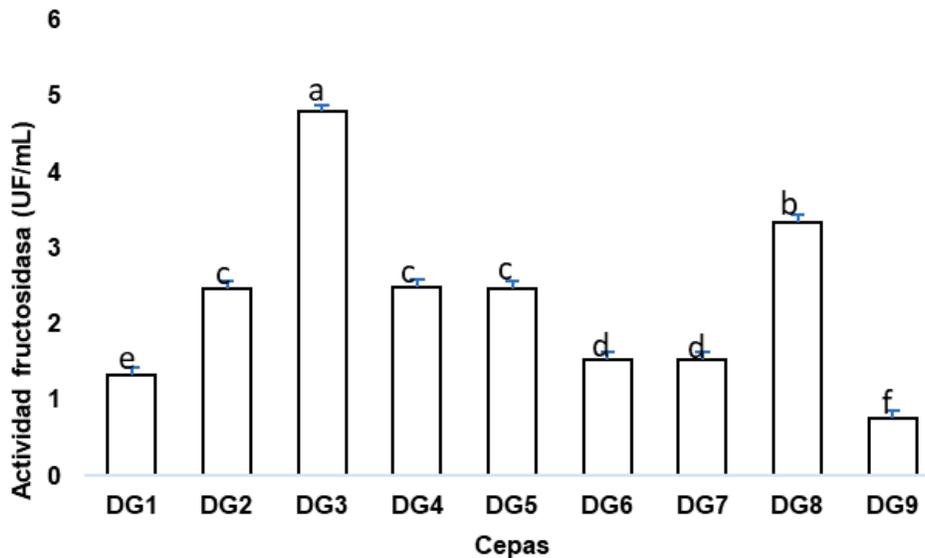


Fig. 10 Actividad fructosidasa en BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii*. Las letras representan la diferencia significativa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

9.5 Producción de EPS

En la **Fig. 11** se observa la producción de EPS posterior a la fermentación con las BAL aisladas de agave después de las 48 h en glucosa, fructanos y fructosa. Con respecto a la producción de EPS, el testigo positivo fue *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 con glucosa los resultados de esta cepa coinciden con lo reportado con Yuksekdog & Aslim (2008) que evaluaron a *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (G12, B3). La BAL que no produjo EPS en glucosa fue *L. paracasei* DG1 y en fructosa fue *L. paracasei* DG8. Mientras que todas las BAL estudiadas produjeron EPS en fructanos de agave.

Las cepas presentadas se pueden clasificar en tres grupos, según su producción de EPS con fructosa: a) Cepas que produjeron más EPS con fructosa que con fructanos o glucosa (*L. paracasei* DG1, *L. paracasei* DG2 y *L. paracasei* DG3) y b) Cepas que produjeron más EPS con fructanos que con fructosa (*L. paracasei* DG4 hasta *E. faecium* DG9) y c) la cepa *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 que produjo igual cantidad de EPS con fructanos y

fructosa. Esta clasificación fue importante porque permite seleccionar a las cepas con la capacidad de formación de biopelículas, asimismo, se encontró que es posible utilizar directamente los fructanos, sin la necesidad de hidrolizarlos hasta fructosa. En particular, la cepa *L. paracasei* OM967272 DG8, no produjo EPS con fructosa, pero si en forma muy abundante con glucosa o fructanos. Este resultado muestra la importancia de la selección y quizás el mejoramiento de las cepas que se puedan utilizar en un futuro para la formación de películas de EPS sin la necesidad de hidrolizar a los fructanos presentes en las plantas del agave.

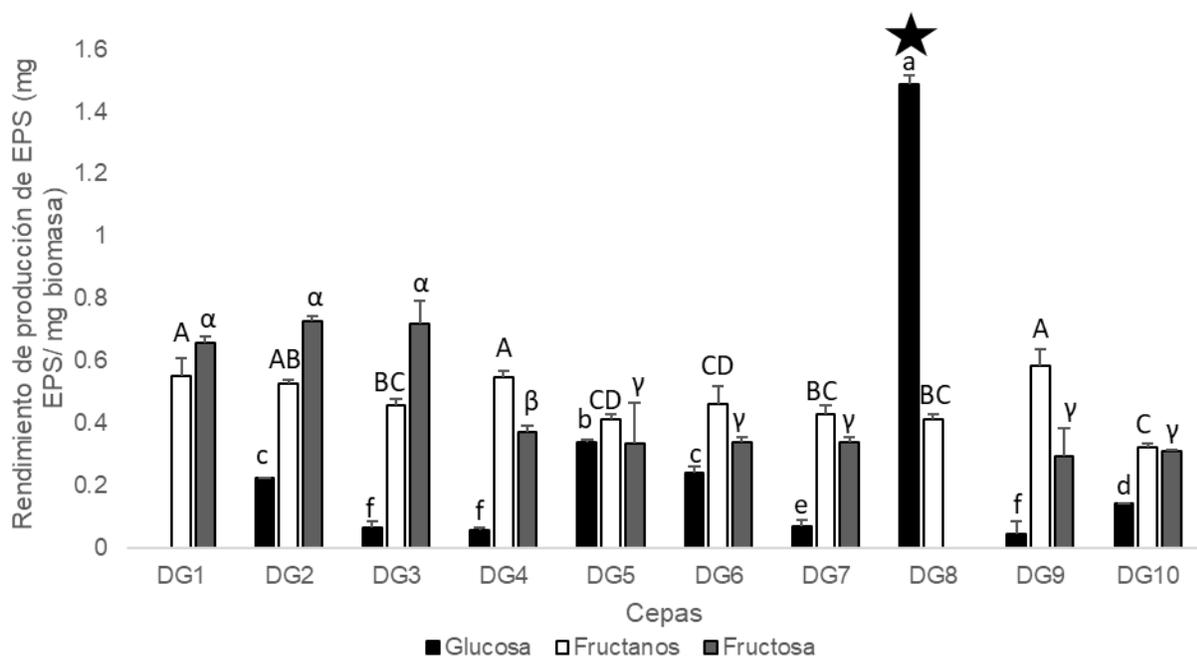


Fig. 11 Rendimiento de producción de EPS con BALs, DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* y con diferentes fuentes de carbono. Las letras indican las diferencias significativas por cepa en cada una de las fuentes de carbono. Las letras minúsculas representan los grupos con glucosa, las mayúsculas con fructanos de agave comercial y las griegas con fructosa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

Por otro lado, se ha reportado que BAL como *E. faecalis* EJRM152 produjo altas concentraciones de heteropolisacáridos a partir de glucosa (Kansandee *et al.*, 2019).

Asimismo, Razack *et al.* (2013) reportaron que *Bacillus subtilis* produce EPS en glucosa, fructosa y sacarosa. También evaluaron que la concentración de 2% de fuente de carbono es la ideal para la producción de EPS porque al aumentar la concentración a 5% disminuye la producción de EPS.

El aumento de la producción de EPS está relacionado con la protección de las células a condiciones de estrés nutricional y ambiental. En el estrés nutricional, las fuentes de carbono y nitrógeno utilizadas en el medio tienen una gran influencia en el rendimiento y la composición del EPS (Hernández *et al.*, 2021).

Es importante la producción de exopolisacáridos (EPS) porque desempeñan un papel importante en la formación de las biopelículas, ya que favorecen la adhesión de las bacterias entre sí mismas y al soporte (Donot *et al.*, 2012).

9.6 Auto agregación

En la **Fig. 12** se observa que las 9 cepas aisladas de agave y el testigo *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 presentan una alta capacidad de auto agregación siendo >71%, es decir tienen la capacidad de adherencia célula-célula entre bacterias de la misma cepa. Kusmiyati *et al.* (2022) reportaron resultados similares con BAL aisladas de leche materna como: *L. paracasei* L19H, *L. casei* L19A y *L. rhamnosus* L19E. Lo anterior coincide con De Lima *et al.* (2020) donde encontraron una auto agregación >70% en *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *E. durans* y *E. faecium* aislados de queso. Por lo tanto, según Trunk *et al.* (2018) la auto agregación puede conducir a la formación de micro colonias y posteriormente a biopelículas.

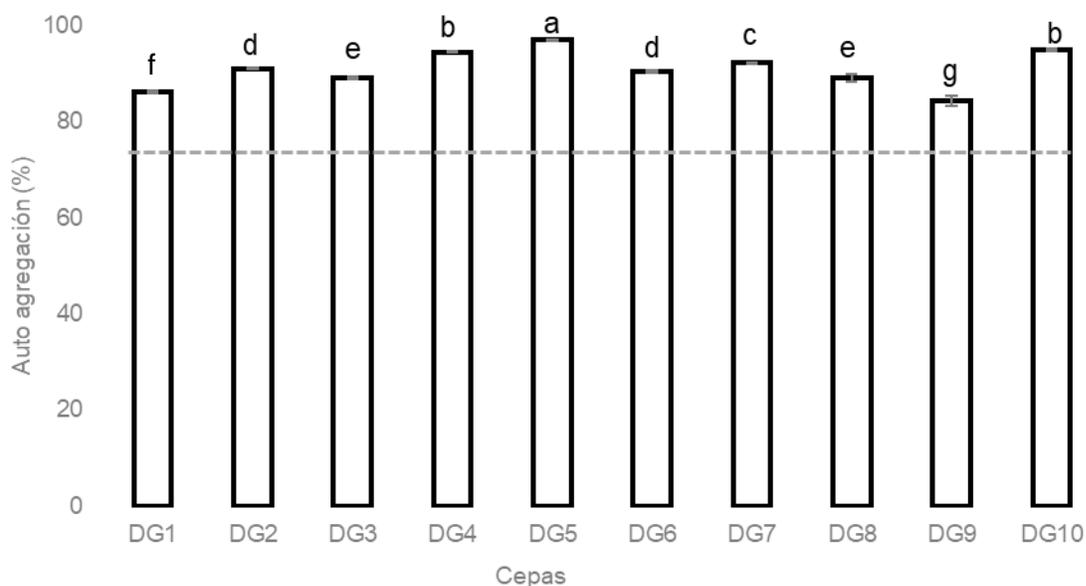


Fig. 12 Auto agregación de BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii*. Categorías: Bajo de 0 a 35%; Medio del 36 al 70%; Alto del 71 al 100%. Las letras indican las diferencias significativas entre las cepas ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

9.7 Hidrofobicidad

En la **Fig. 13** se observa que hubo diferencias significativas entre el porcentaje de hidrofobicidad evaluado con cloroformo, acetato de etilo y xileno.

En cloroformo se obtuvieron mejores resultados con un porcentaje de hidrofobicidad mayor a 60%, excepto en la *E. faecium* DG9, en la cual no hubo diferencia significativa con xileno ($p < 0.01$). Estas diferencias sugieren variaciones en la composición de las paredes celulares de las BAL, especialmente cuando la hidrofobicidad se midió con acetato de etilo o xileno, que son solventes menos hidrofóbicos que el cloroformo. La afinidad alta o baja por un solvente no excluyó la afinidad simultánea por el otro solvente, lo que sugiere que la superficie celular es muy compleja. En general, se ha informado que las BAL demuestran una gran heterogeneidad para la adhesión a varios hidrocarburos y estas diferencias se relacionan con la superficie celular que se deben a variaciones en los niveles de expresión

de las proteínas de distintas especies (Andrabi *et al.*, 2016; Unban *et al.*, 2021; Xu *et al.*, 2018). Los solventes ayudan a determinar características de las superficies celulares; el cloroformo es un disolvente monopolar y es un ácido de Lewis, aceptor de electrones, con atracción por estas sustancias capaces de ceder electrones. El acetato de etilo es un disolvente monopolar que es atraído a sustancias ácidas. El xileno es un solvente no polar (Ocana *et al.*, 1999; Kumari *et al.*, 2022).

Los resultados obtenidos con cloroformo son consistentes con los reportados por Unban *et al.* (2021) en sus estudios con *L. plantarum* A9-2, *L. pentosus* A14-6, *L. pentosus* A26-8, *P. pentosaceus* CMY9 y *L. pentosus* CMY46. Además, Grujović *et al.* (2019) encontraron que BAL aisladas de queso, específicamente dos cepas de *L. lactis subsp. lactis* KGPMF54 y KGPMF57, muestran una mayor afinidad por el cloroformo en comparación con el acetato de etilo.

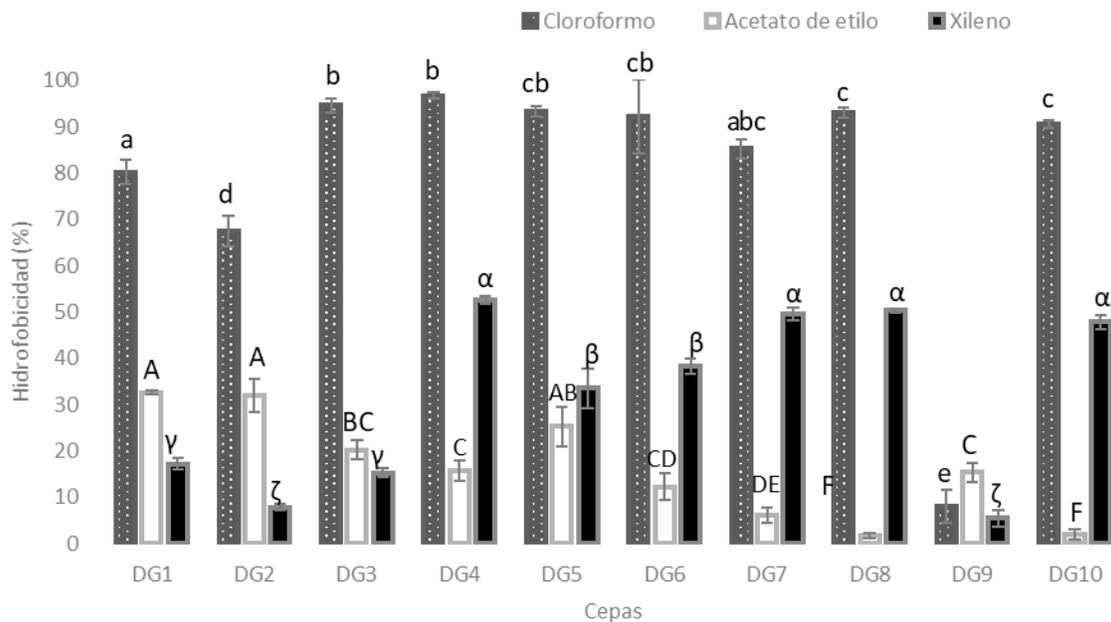


Fig. 13 Hidrofobicidad de las BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* empleando diferentes solventes: cloroformo, acetato de etilo y xileno. Categorías: Bajo de 0 a 35%; Medio del 36 al 70%; Alto del 71 al 100%. Las letras minúsculas representan los grupos con cloroformo, las mayúsculas con acetato de etilo y

las griegas con xileno ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

Los principales factores que influyen en la hidrofobicidad de la superficie celular incluyen proteínas, glicoproteínas, ácidos teicoicos y lipoteicoicos, fibrillas superficiales y adhesinas en la pared celular. Algunas especies de *Lactobacillus* como *L. casei* ATCC 393 poseen proteínas de la capa superficial ancladas a la pared celular, lo que les otorga una hidrofobicidad relativamente alta. En contraste, otras BAL, carecen de estas proteínas, pero tienen una superficie rica en polisacáridos, que actúa como un recubrimiento hidrófilo (Petrova *et al.*, 2019)

Para la formación de biopelículas es muy importante entender la naturaleza de la superficie celular para encontrar la afinidad con el soporte que va a tener las características de cargas iónicas adecuadas para la adherencia celular, según estos resultados las biopelículas se pueden formar más fácilmente en plásticos que en maderas o cristales de sílice y la característica que se detectó es que la superficie celular es básica (Qureshi *et al.*, 2005).

9.8 Formación de biopelículas con distintas fuentes de carbono

En la **Fig. 14** se muestra la formación de biopelículas utilizando tres fuentes diferentes de carbono: glucosa, fructanos y fructosa. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los tres carbohidratos, siendo los fructanos de agave los que mejor favorecieron la formación de biopelículas, seguidos de la glucosa y, por último, la fructosa. En los medios con fructanos, todas las BAL estudiadas fueron fuertemente formadoras de biopelículas, destacándose las cepas *Lacticaseibacillus paracasei* DG2, *L. paracasei* DG3, *L. paracasei* DG4 y *L. paracasei* DG8, sin diferencias significativas entre ellas ($p < 0.01$). A continuación, *L. paracasei* DG5 mostró un rendimiento similar al de *L. paracasei* DG3, mientras que las cepas *L. paracasei* DG6, *L. paracasei* DG7 y *Enterococcus faecium* DG9 también formaron biopelículas, sin mostrar diferencias significativas ($p < 0.01$).

En el medio con glucosa, la cepa *L. paracasei* DG2 presentó los mejores resultados, seguida de *L. paracasei* 7 DG1, *L. paracasei* DG3 y *L. paracasei* DG8, sin diferencias

significativas entre ellas ($p < 0.01$). Aunque el resto de las cepas también fueron formadoras de biopelículas, *L. paracasei* DG6 mostró una formación más moderada. Finalmente, en el medio con fructosa, *L. paracasei* DG8 fue la única cepa que se destacó como fuertemente formadora de biopelículas.

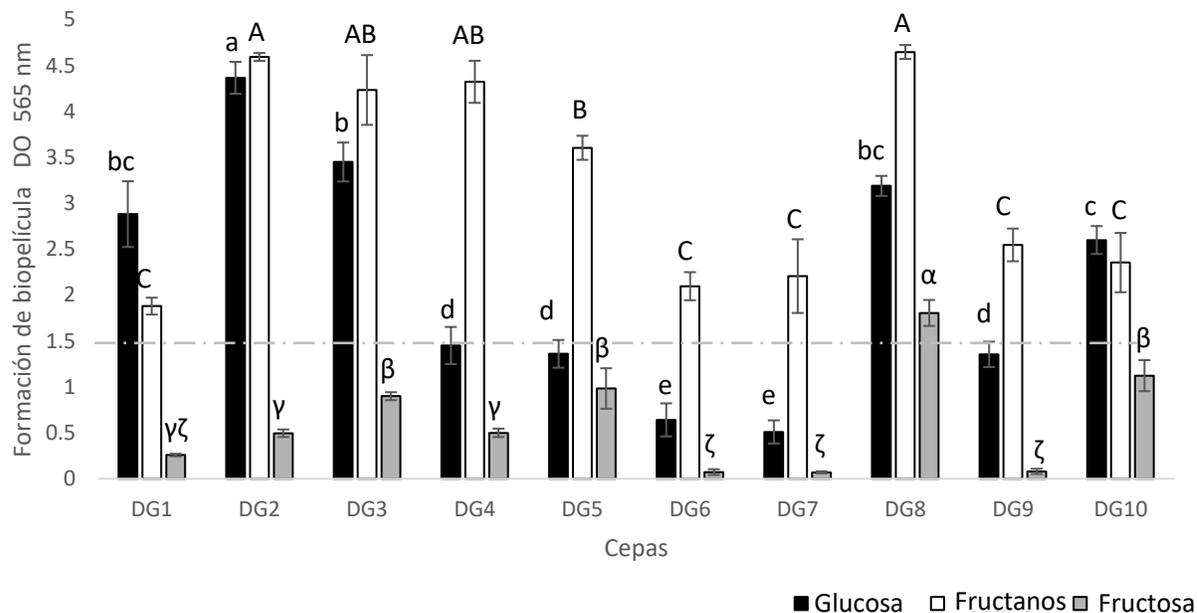


Fig.14 Formación de biopelículas con glucosa, fructanos y fructosa con las BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii*. Bajo: 0 a 0.499 Medio: 0.5 a 1.499 Alto: >1.5. Las letras indican las diferencias significativas por cepa en cada una de las fuentes de carbono. Las letras minúsculas representan los grupos con glucosa, las mayúsculas con fructanos y las griegas con fructosa ($p < 0.01$) (Fuente: Martha-Lucero *et al.*, 2023).

Los resultados obtenidos con glucosa coinciden con los de Lebeer *et al.* (2007), quienes demostraron que este carbohidrato fomenta la formación de biopelículas de manera moderada. Además, analizaron que, al añadir inulina a las fermentaciones con glucosa, las cepas como *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG aumentaron en un 50% la formación de

biopelículas. Atribuyeron este aumento a que los polisacáridos complejos, como la inulina, producen exopolisacáridos (EPS) y mejoran la adherencia de las bacterias al soporte. Este hallazgo refuerza la importancia de las fuentes de carbono complejas en el proceso de biopelícula.

Por su parte, Jiang *et al.* (2018) también estudiaron la capacidad de *L. rhamnosus* GG para formar biopelículas y observaron que esta cepa tenía mayor capacidad de formar biopelículas con glucosa, seguida de sacarosa, fructosa y lactosa. Este patrón es consistente con los resultados de nuestro estudio, donde se observó que la glucosa fue una fuente eficaz para la formación de biopelículas, aunque con una respuesta menos destacada en comparación con los fructanos de agave.

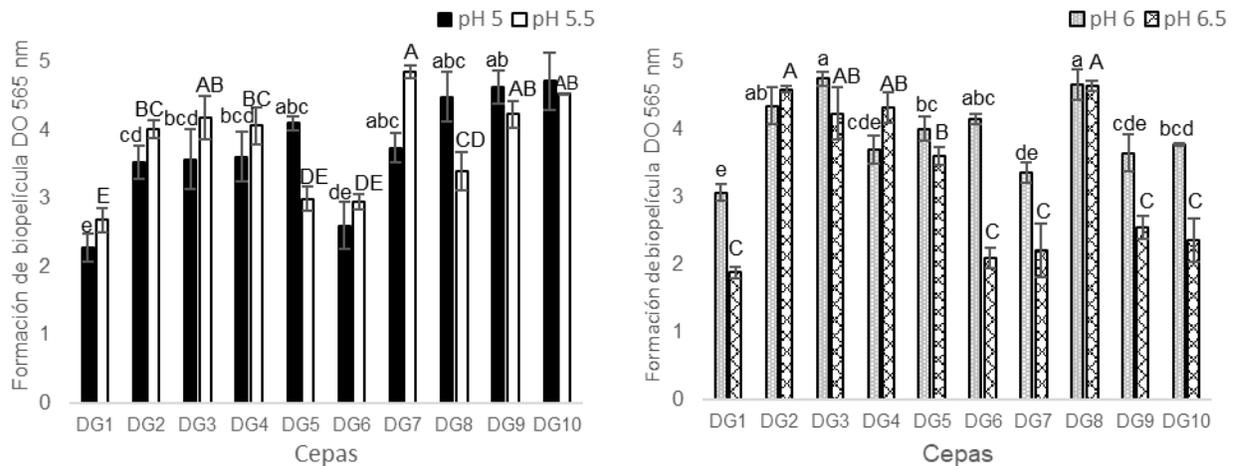
Slížová *et al.* (2015) indicaron que el crecimiento de las BAL no siempre es inversamente proporcional a la formación de biopelículas. En su análisis con fructosa, las cepas de *Lactobacillus reuteri* L2/6 y B2/1 mostraron una formación de biopelículas inferior a 1, al igual que la mayoría de las cepas analizadas. Sin embargo, la cepa *L. paracasei* DG8 presentó un valor superior a 1.5, lo que sugiere que ciertas cepas tienen una mayor capacidad para formar biopelículas con fructosa en comparación con otras.

En cuanto a los fructanos, no se han encontrado antecedentes sobre su uso como única fuente de carbono para la formación de biopelículas. Sin embargo, se ha observado que las BAL poseen fructosiltransferasas, enzimas con un mecanismo de acción similar a las glicosiltransferasas, que están asociadas con la formación de biopelículas a partir de sacarosa (Schwab *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2020). Algunos estudios previos han demostrado que el uso de sacarosa incrementa la formación de biopelículas. Por ejemplo, Joshi y Kojiam (2014) encontraron un aumento del 21.43% en la formación de biopelículas de *Leuconostoc lactis* cuando se utilizó sacarosa, en comparación con glucosa y fructosa. Otros estudios, como los de Awad & Ahmaed (2018), también confirmaron que la adición de sacarosa al 10% favorece la formación de biopelículas en *Leuconostoc mesenteroides*.

9.9 Formación de biopelículas con distintos valores de pH



De acuerdo con los resultados anteriores se analizó la formación de biopelículas con fructanos ajustando el pH, lo cual se muestra en la **Fig. 15**, dónde se analizó la formación de biopelículas ajustando el pH inicial a 5, 5.5, 6 y 6.5, mostrando que el comportamiento de la formación de biopelículas se ve afectado de distintas maneras con respecto al pH. Según el análisis estadístico los mejores pH fueron 5.5 y 6 sin mostrar diferencia significativa ($p < 0.01$).



a)

b)

Fig. 15 Formación de biopelículas con BALs, DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* a distintos pH utilizando como fuente de carbono fructanos. Las letras indican la diferencia significativa entre las cepas en cada tratamiento. En la Fig. 15a las letras minúsculas indican el pH 5 y las letras mayúsculas el pH 5.5 con respecto a la Fig. 15b las letras minúsculas indican el pH 6 y las letras mayúsculas el pH 6.5 ($p < 0.01$). La capacidad de formar biopelículas se define como: baja: 0 a 0.499; media: 0.5 a 1.499; alta: > 1.5 (Fuente: Martha-Lucero et al., 2023).

En la **Fig. 15a**, se muestra que, a un pH de 5, las cepas de *L. paracasei* DG5, *L. paracasei* DG8, *E. faecium* DG9 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 fueron las que presentaron los mejores rendimientos en formación de biopelículas, sin mostrar diferencias significativas ($p < 0.01$). En un pH de 5.5, las cepas destacadas fueron *L. paracasei* DG3, *L. paracasei* DG7, *E. faecium* DG9 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10, nuevamente sin diferencias significativas ($p < 0.01$).

Por otro lado, en la **Fig. 15b**, a un pH de 6, las cepas más productivas en cuanto a formación de biopelículas fueron *L. paracasei* DG2, *L. paracasei* DG3, *L. paracasei* DG6 y *L. paracasei* DG8, sin diferencias significativas ($p < 0.01$). A un pH de 6.5, las cepas más destacadas fueron *L. paracasei* DG2, *L. paracasei* DG3, *L. paracasei* DG4 y *L. paracasei* DG8, nuevamente sin diferencias significativas ($p < 0.01$).

Una cepa de particular interés fue *L. paracasei* DG8, que mostró una alta formación de biopelículas, superior a 4, sin diferencias significativas ($p < 0.01$) en los pH de 5, 6 y 6.5. Otra cepa destacada fue *E. faecium* DG9, que mostró una baja formación de biopelículas en condiciones neutras, pero un incremento en la formación de biopelículas en medios ácidos, lo que puede ser atribuido al estrés inducido por el entorno ácido, como sugiere Emanuel *et al.* (2010). Este comportamiento es similar al de la cepa *E. faecalis* EC41, reportada por Akoğlu (2020). Además, estudios previos han demostrado que diversas BAL, como *Enterococcus faecium* EC63 y *Lactococcus lactis* LC62, pueden tolerar condiciones de pH variables y modificar su comportamiento, incrementando la producción de biopelículas bajo condiciones de pH ácido, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio.

9.10 Formación de biopelículas con distintas concentraciones de fructanos

En la **Fig. 16** se observa el comportamiento de las cepas con distintas concentraciones de fructanos (0, 10, 20 y 30 g/L), no encontrando diferencia significativa ($p < 0.01$) entre las concentraciones de fructanos de 10 y 30 g/L.

La formación de las biopelículas siguió un patrón complejo para todas las cepas. Sin fructanos se produjeron biopelículas quizás debido a la utilización de los otros componentes del medio MRS. La adición de fructanos a las concentraciones de 10 g/L y 30 g/L aumentó significativamente la producción de las biopelículas, pero con el nivel de 20 g/L se disminuyó dicha producción. Estos resultados sugieren la interacción no lineal del uso de los fructanos con otros caminos metabólicos.

Slížová *et al.* (2015) observaron una formación de biopelículas altamente positiva al reducir

las fuente de carbono en los casos independientes de lactosa (10 g/L), galactosa (10 g/L) y glucosa (10 g/L), de dos cepas de *Lactobacillus reuteri* L2/6 y B10/1. Sin embargo, un aumento gradual en la concentración de azúcar desencadenó una disminución significativa en la formación de biopelículas.

El principal resultado de estos experimentos es la comprobación que, para todas las cepas aquí estudiadas, la adición de fructanos con la concentración de 30 g/L, se acompaña de una, apreciable formación de biopelículas.

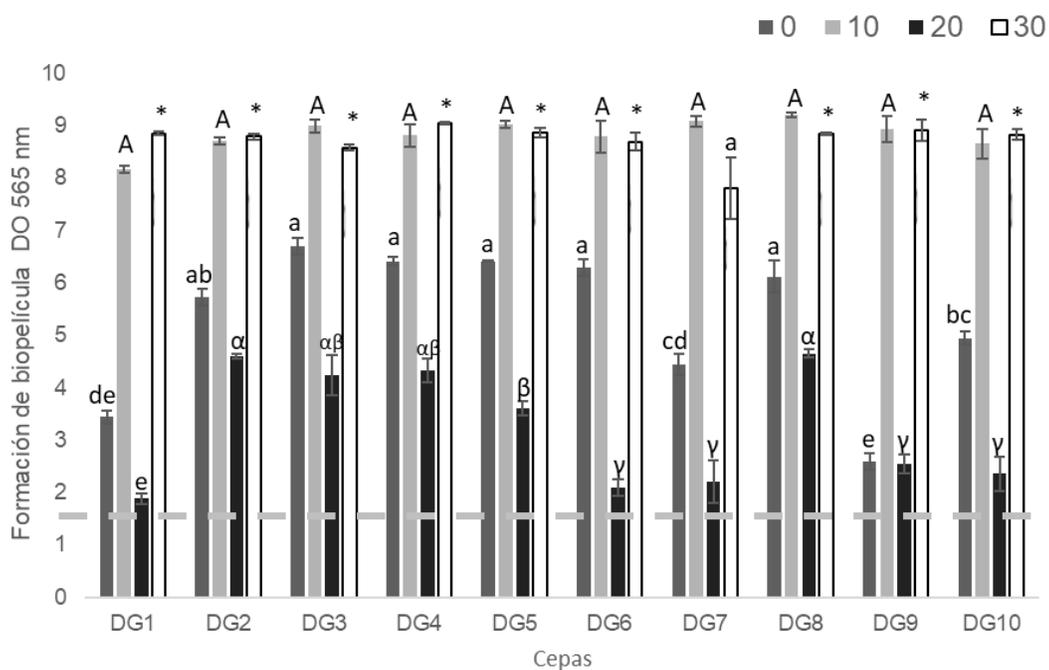


Fig. 16 Formación de biopelículas con distintas BALs, DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* a distintas concentraciones de fructanos: 0, 10, 20 y 30 g/L. Las letras indican la diferencia significativa entre las cepas por cada concentración de forma independiente Las letras minúsculas representan los grupos con una concentración de 0 g/L, las mayúsculas con 10 g/L, las griegas con 20 g/L y los asteriscos con 30 g/L ($p < 0.01$). La capacidad de formar biopelículas se define según la DO como: baja: 0 a 0.499; media: 0.5 a 1.499; alta: >1.5.

9.11 Formación de biopelículas con distintos tiempos de fermentación

En la **Fig. 17** se observa que la formación de biopelículas con fructanos de agave es mejor a los 5 días en todas las cepas excepto en la cepa *E. faecium* DG9 que es mejor a los 3 días. Estos resultados indican que para la mayor parte de las cepas *L. paracasei* (DG1 a DG8) las biopelículas son relativamente estables pues su cantidad aumentó con el tiempo de fermentación de 3 a 5 días. La disminución con la cepa *E. faecium* DG9 puede estar dado a que este microorganismo aprovecha como fuente de energía los EPS que son los que dan estabilidad a la biopelículas, el consumo de EPS ha sido reportado en Harutoshi, (2013). Estos resultados indican la importancia de la selección adecuada de las cepas para los estudios posteriores.

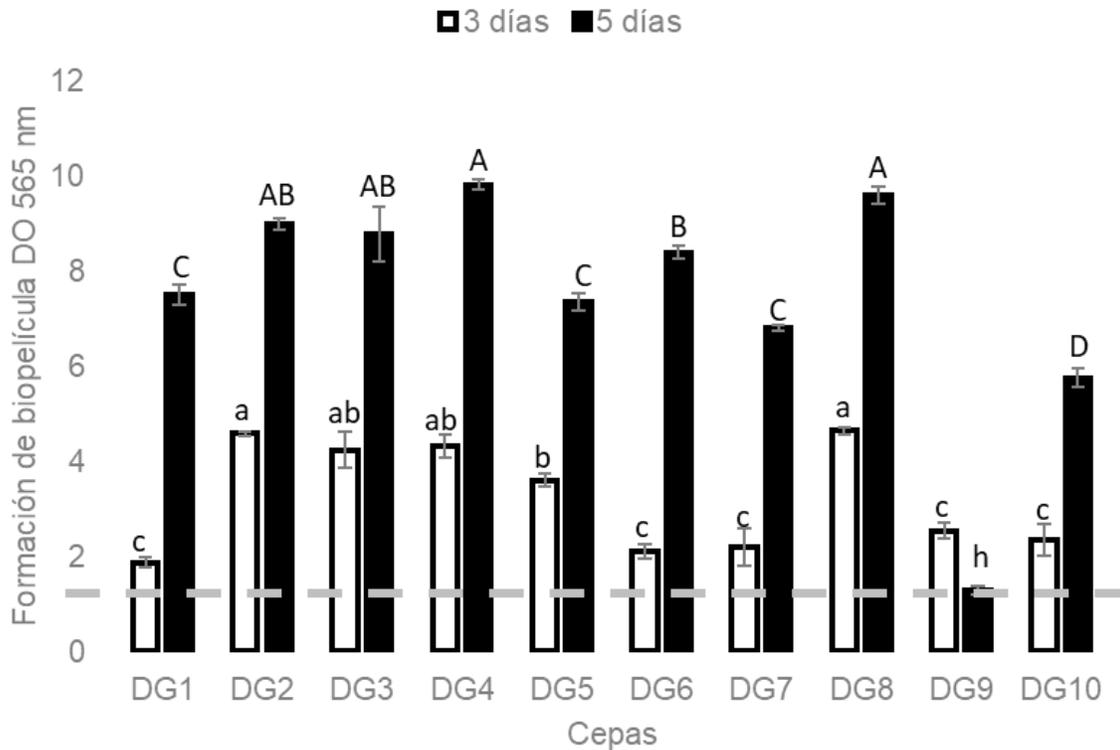


Fig. 17 Formación de biopelículas con BALs DG1 a DG8: *L. paracasei*, DG9: *E. faecium* y DG10: *L. delbrueckii* a distintos tiempos 3 y 5 días utilizando como fuente de carbono: fructanos de agave. Las letras indican la diferencia significativa entre las cepas por cada tiempo. Las letras minúsculas representan los grupos a los 3 días, las mayúsculas con 5 días ($p < 0.01$). La capacidad de formar biopelículas se define de acuerdo con la DO como: baja: 0 a 0.499; media: 0.5 a 1.499; alta: > 1.5 .

Demerci *et al.* (1995) hallaron que con *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* ATCC 11443, la formación de biopelículas aumenta con el tiempo del proceso. Asimismo, los resultados de Chiappe *et al.* (2020) son coincidentes con los obtenidos en este estudio, pero trabajando con *Lactobacillus fermentum* ATCC 9338. Sin embargo, los autores encontraron que al hacer el estudio con *Pediococcus pentosaceus* CRL 922 no se muestra una acumulación progresiva de la biopelícula más allá de las primeras horas de proceso. Por su parte Kumar *et al.* (2017) demostraron que, en fermentaciones de 48 horas, *L. casei* Y1, *L. plantarum* KF y *L. plantarum* ATCC8014 tuvieron la mayor formación de biopelículas

comparado con las fermentaciones a 36 h. De hecho, los autores no encontraron diferencias significativas a las 60 h. Finalmente, Sapalina & Retnaningrum (2020) encontraron que algunas cepas de *Lactobacillus brevis* KA2, KA5 y KC4, son capaces de formar biopelículas, pero después de las 72 h se observa un decremento en la concentración. Esto quiere decir que tanto la formación de biopelículas como su concentración, siempre va a ser dependiente de la cepa utilizada.

9.12 Formación de biopelículas con distintas fuentes de nitrógeno

En la **Fig. 18** se observa la formación de biopelículas de la cepa con los mejores resultados de los experimentos anteriores que fue *L. paracasei* DG8, además se analizó la cepa del género distinto, *E. faecium* DG9, en la búsqueda de mejores resultados, y por último se analizó *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 ya que es un género que está ampliamente reportado en fermentaciones lácticas.

Los resultados muestran que *L. paracasei* DG8 produjo mayor cantidad de biopelícula en el medio testigo y en presencia de las fuentes de nitrógeno de forma independiente. Sin embargo, esta producción disminuyó cuando se añadieron fuentes de carbono como glucosa y fructanos. Con fructanos, se observó una formación más alta de biopelícula en la mayoría de las fuentes de nitrógeno, excepto con peptona, donde no hubo diferencia significativa entre los dos carbohidratos evaluados.

En el caso de la triptona de soya, los mejores resultados se obtuvieron con glucosa como fuente de carbono. Por otro lado, el extracto de levadura se destacó como la mejor fuente de nitrógeno para esta cepa, alcanzando la mayor densidad óptica ($DO=4.29 \pm 0.02$) en la formación de biopelículas. Esto sugiere que la combinación de fructanos con ciertas fuentes de nitrógeno puede influir significativamente en la capacidad de la cepa para formar biopelículas.

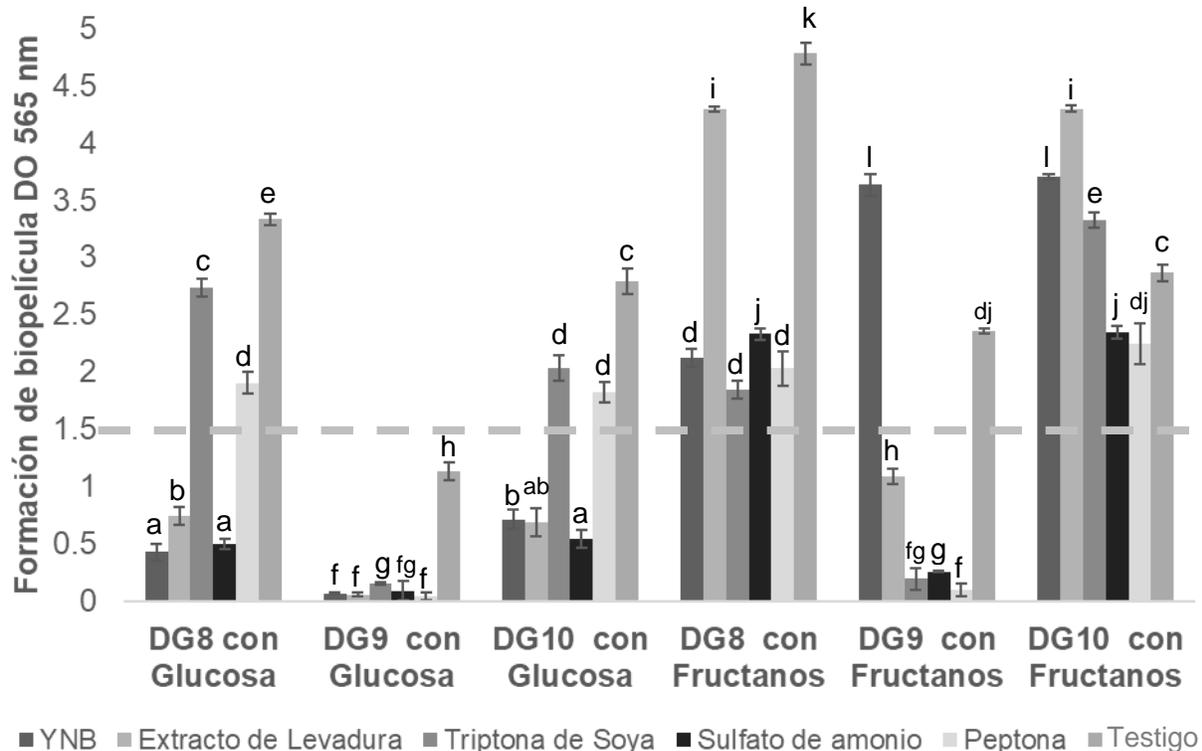


Fig. 18 Formación de biopelículas con distintas fuentes de nitrógeno y fuentes de carbono. El testigo corresponde a una mezcla de proteínas (extracto de levadura, extracto de carne y peptona) adicionando la fuente de carbono al grupo de análisis. La capacidad de formar biopelículas se define de acuerdo con la DO como: baja: 0 a 0.499; media: 0.5 a 1.499; alta: >1.5. Las letras indican las diferencias significativas entre las cepas, fuente de carbono y fuente de nitrógeno ($p < 0.01$).

Para *E. faecium* DG9, no se observó formación de biopelículas en presencia de glucosa, con excepción del medio testigo. No obstante, al emplear fructanos de agave, los mejores resultados se obtuvieron en el medio enriquecido con YNB ($DO = 3.64 \pm 0.098$), superando al testigo ($DO = 2.36 \pm 0.02$). Además, el extracto de levadura también mostró una buena formación de biopelículas ($DO = 1.09 \pm 0.07$). En las demás condiciones evaluadas, el uso de fructanos no favoreció significativamente la formación de biopelículas.

Por su parte, *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 mostró un mejor desempeño con fructanos

en comparación con glucosa. Al utilizar fructanos, se registró un incremento en la formación de biopelículas con fuentes de nitrógeno independientes como triptona de soya ($DO=3.32 \pm 0.06$), extracto de levadura ($DO=4.29 \pm 0.02$) y YNB ($DO=3.7 \pm 0.025$), en relación con el medio testigo ($DO=2.865 \pm 0.0712$). Esto resalta la capacidad de esta cepa para aprovechar los fructanos en combinación con ciertas fuentes de nitrógeno para potenciar la formación de biopelículas. De manera similar a las condiciones anteriores, se observa la dependencia del tipo de cepa con la formación de biopelículas.

De forma independiente, Liu *et al.* (2024) han evaluado diversas fuentes de nitrógeno orgánicas para el cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* Gr18. Los autores determinaron que la triptona de soya mostró formación de biopelículas ($DO=1.5$), mientras que otras fuentes como el extracto de carne y la peptona no activan de manera similar la formación de biopelículas ($DO=1.25$). Estos datos coinciden con los resultados obtenidos con *L. paracasei* DG8 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10, donde se observó una mayor producción de biopelículas utilizando estas mismas fuentes de nitrógeno en combinación con glucosa. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo representan una mejor alternativa de producción de biopelículas ya que la producción con las cepas y las condiciones estudiadas fue mayor a lo reportado por los distintos autores.

Por otro lado, la **Fig. 18** muestra que las fuentes orgánicas de nitrógeno son más efectivas en la producción de biopelículas que la fuente inorgánica (sulfato de amonio). Sin embargo, los resultados obtenidos con las cepas *L. paracasei* DG8 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 son comparables a los de otras cepas, pero en presencia de sulfato de amonio.

Los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que muchas BAL tienen la capacidad y necesidad de hidrolizar péptidos y proteínas para incorporar aminoácidos libres en su metabolismo, como lo sugieren Yao *et al.* (2022). Esto coincide con lo señalado por Degeest *et al.* (2002), quienes destacan que el extracto de levadura y la peptona no solo proporcionan nitrógeno esencial para el crecimiento celular y la producción de exopolisacáridos (EPS), sino que también aportan nutrientes complejos como vitaminas, minerales, purinas y pirimidinas, los cuales desempeñan un papel clave en la formación de

biopelículas.

Midik *et al.* (2020) evaluaron la influencia de distintas fuentes de nitrógeno en la producción de EPS, un componente indispensable para la formación de biopelículas, encontrando mejores resultados al combinar diversas fuentes proteicas, hallazgo que coincide con los resultados de este estudio. Estos autores también destacaron la producción de EPS con sulfato de amonio, lo que sugiere que fuentes inorgánicas como las sales de amonio pueden complementar, en lugar de excluir, a las fuentes orgánicas en el desarrollo de biopelículas.

En conjunto, estos resultados resaltan la importancia de las fuentes de nitrógeno, tanto orgánicas como inorgánicas, en el metabolismo de las BAL y su capacidad para formar biopelículas, lo que podría ser clave para optimizar procesos industriales y aplicaciones biotecnológicas.

9.13 Microscopía electrónica de Barrido (SEM)

En la **Fig. 19** se muestra cómo *L. paracasei* DG8, *E. faecium* DG9 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 forman biopelículas sobre las esferas de polipropileno. En la **Fig. 19a**, se observa una estructura bacteriana con canales interconectados que, según Quan *et al.* (2022), facilitan el transporte de agua, nutrientes y desechos, lo cual coincide con lo descrito por Hall-Stoodley *et al.* (2004). Este tipo de organización estructural ya ha sido reportado en estudios similares, como el de Kubota *et al.* (2018), donde a través de SEM se evidenció la formación de agregados en *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus brevis*.

En la **Fig. 19b** se aprecia un aglomerado bacteriano más pequeño en comparación con las **Fig. 19a y 19c**. Este hallazgo concuerda con los resultados previos que indicaron que *E. faecium* DG9 no es una cepa altamente eficiente en la formación de biopelículas. Por otro lado, en la **Fig. 19c** se observa cómo las bacterias de *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10 están adheridas entre sí y a la superficie de polipropileno, presentando una organización con canales similar a la de la **Fig. 19a**. Además, se identifican células aisladas en las cercanías del aglomerado principal, que parecen estar iniciando su unión.

Estos resultados sugieren que en las esferas de polipropileno pueden formarse múltiples biopelículas independientes en una misma superficie, evidenciando la capacidad diferencial de las BAL para adherirse y organizarse según las condiciones del medio.

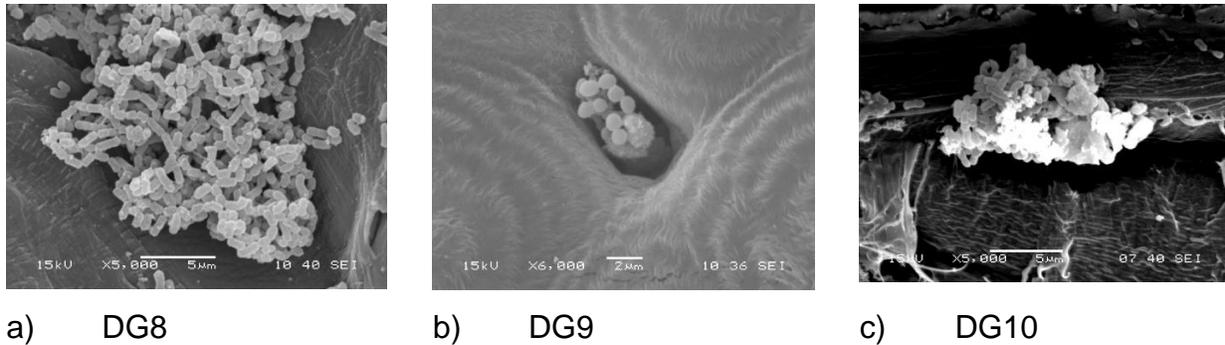


Fig. 19 Imágenes de microscopía SEM de BAL: a) *L. paracasei* DG8, , b) *E. faecium* DG9 y *L. delbrueckii* NCFB 2772 DG10

9.14 Producción de AcL con biopelículas

Según los resultados analizados anteriormente, la cepa más eficiente para la formación de biopelículas fue *L. paracasei* DG8. Las condiciones óptimas identificadas incluyeron 30 g de fructanos de agave, una combinación de proteínas (extracto de levadura, peptona y extracto de carne), un pH inicial de 6.5 y un tiempo de fermentación de 5 días. Con base en estos parámetros, se realizó la formación de biopelículas en perlas de polipropileno para la producción de AcL, reutilizando las perlas durante tres ciclos de fermentación (**Fig. 20**) y triplicando la producción de AcL en comparación con las células planctónicas.

En la fermentación planctónica se obtuvo una producción de AcL de 8.66 ± 0.4 g/L, sin diferencias significativas en comparación con las fermentaciones con biopelículas en los ciclos uno (8.56 ± 0.8 g/L) y dos (7.73 ± 0.5 g/L). Sin embargo, en el ciclo tres, correspondiente a 14 días de fermentación, se observó una disminución considerable en la producción de AcL (2.57 ± 0.18 g/L), lo que representa una reducción del 66%. Este descenso se asoció con una disminución del pH, indicando una falta de actividad

metabólica suficiente para generar acidez en el medio.

Demirci y Pometto (1995) lograron un proceso de producción de AcL que se extendió por 2 meses y abarcó 24 ciclos utilizando *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* ATCC 11443. Para futuros experimentos, se recomienda evaluar otros materiales como soporte, ya que estos autores reportaron diferencias en la formación de biopelículas dependiendo del material utilizado. Una mayor formación de biopelículas podría optimizar la producción de AcL y extender la viabilidad del sistema en ciclos prolongados.

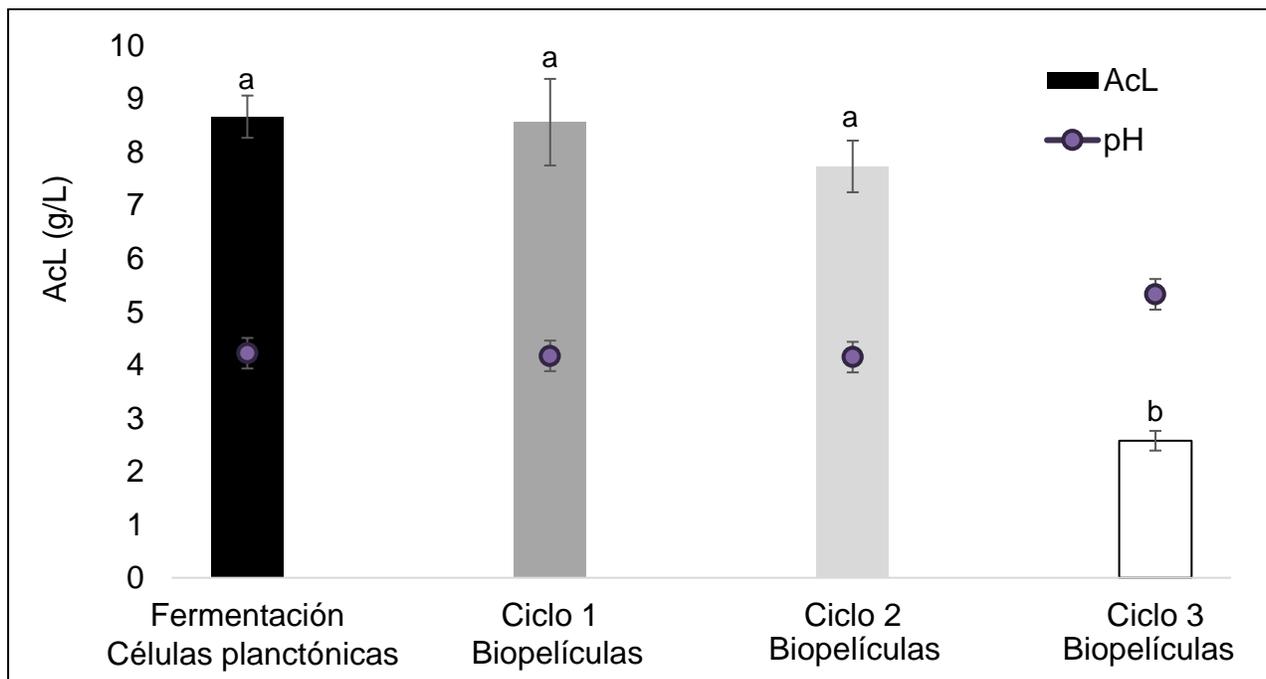


Fig. 20 Producción de AcL en repetidos ciclos con perlas de polipropileno. Las barras comparan la concentración de AcL en g/L y los círculos representan el pH de cada una de las fermentaciones lácticas. Antes de cada ciclo, las perlas se lavaron con una solución de SBF 1X para eliminar las células que no estaban fuertemente adheridas y se hizo un recambio de medio de cultivo.

9.15 Evaluación de jugo de agave para formación de biopelículas

Una alternativa para la obtención de AcL vía fermentativa, es el jugo o savia de las hojas

de los agaves son un subproducto de la producción de pulque. Para obtenerlo el grupo de trabajo por medio del Dr. Viniegra-González desarrolló un prototipo de una máquina que extrae este jugo, junto con la fibra, para uso textil y la pulpa como forraje para la alimentación de ovinos o bovinos (**Fig. 21**).



Fig. 21 Desfibrado de la hoja de agave para la separación del jugo, fibra y pulpa

En la **Tabla 7** se muestra el contenido de carbohidratos totales, polisacáridos de fructanos (con peso molecular similar a la inulina de achicoria), sacarosa, fructosa, glucosa, proteínas, saponinas y pH en las fracciones de jugo de la hoja de agave (base y punta). Los resultados indican una diferencia notable en el contenido de carbohidratos entre ambas fracciones.

De acuerdo con Montañez-Soto *et al.* (2011), se observa una variación en las fracciones de la hoja de Agave tequilana, con una mayor concentración de azúcares reductores en la base, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este análisis. En ese mismo estudio, evaluaron el porcentaje de proteínas en la hoja y no identificaron diferencias significativas entre la parte superior e inferior.

Por otro lado, Gallardo-Martínez (2023) analizó el jugo de la hoja de agave, reportando una concentración de carbohidratos totales de 189.5 g/L, superior a lo observado en este trabajo. Estas diferencias podrían atribuirse al estado de madurez de la hoja. Además, este autor evaluó el contenido de saponinas, encontrando un valor de 0.449 g/L, un rango similar al presentado en este estudio. De manera consistente, también se observó una diferencia en la concentración de saponinas entre la base y la punta de la hoja, siendo mayor en la base.

Tabla 7. Caracterización del jugo de la hoja del agave

	Jugo de hoja de agave punta	Jugo de hoja de agave base	Jugo de hoja de Agave (Gallardo-Martínez, 2023)
Carbohidratos totales (g/L)	100.45 ± 1.37	76.92 ± 6.45	189.93 ± 3.38
Fructanos *GP = 22.7 (g/L)	75.94 ± 0.88	49.25 ± 1.33	NR
Sacarosa (g/L)	1.35 ± 0.12	1.25 ± 0.13	NR
Fructosa (g/L)	6.06 ± 0.76	6.24 ± 1.08	NR
Glucosa (g/L)	12.26 ± 2.1	15.38 ± 0.16	50.72 ± 2.5
Proteína (g/L)	17.16 ± 1.38	14.05 ± 0.21	12.6 ± 0.1
pH	4.97 ± 0.01	5.06 ± 0.02	5.5
Saponinas (g/mL)	0.05 ± 0.026	0.1 ± 0.036	0.45 ± 0.77

*GP: Grado de polimerización, NR: No reportado

9.16 Distribución de polisacáridos en el jugo de la hoja de agave

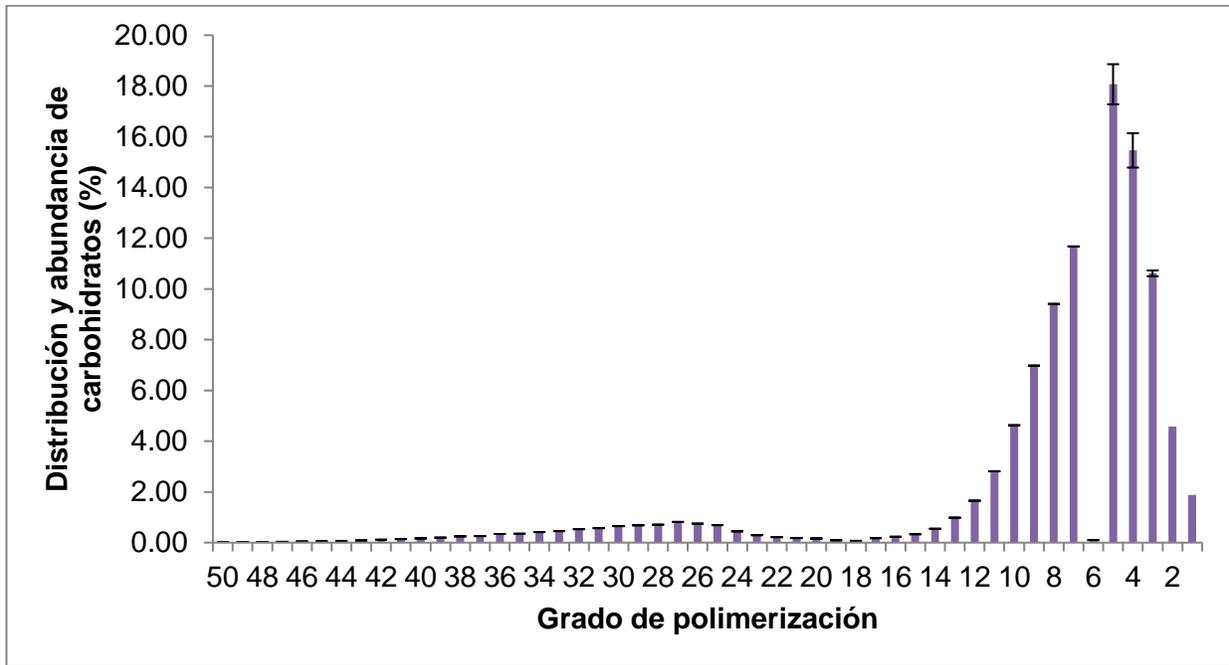
En la **Fig. 22** se muestra la distribución de carbohidratos presentes en las dos fracciones de la hoja de agave: **Fig. 22 (a)** punta y **Fig. 22 (b)** base. En la punta (**Fig. 22 a**) predominan los oligosacáridos de un GP <10 = 76.92%, posteriormente se encuentran los de un

GP>10=16.63%, GP >11-30= 12.5%, GP (1 a 2) =6.45%, GP <30= 4.13%, Sacarosa (GP=2) = 1.576% y Fructosa + Glucosa (GP=1) =1.875%. En la base (**Fig. 22 b**) la distribución fue de la siguiente manera el GP <10 = 63.60%, posteriormente se encontraron los de un GP (1 a 2) = 21.58%, Fructosa + Glucosa (GP=1) =19.81%, GP>10=14.82%, GP >11-30= 10.93 %, GP <30= 3.89% y Sacarosa (GP=2) = 1.576%.

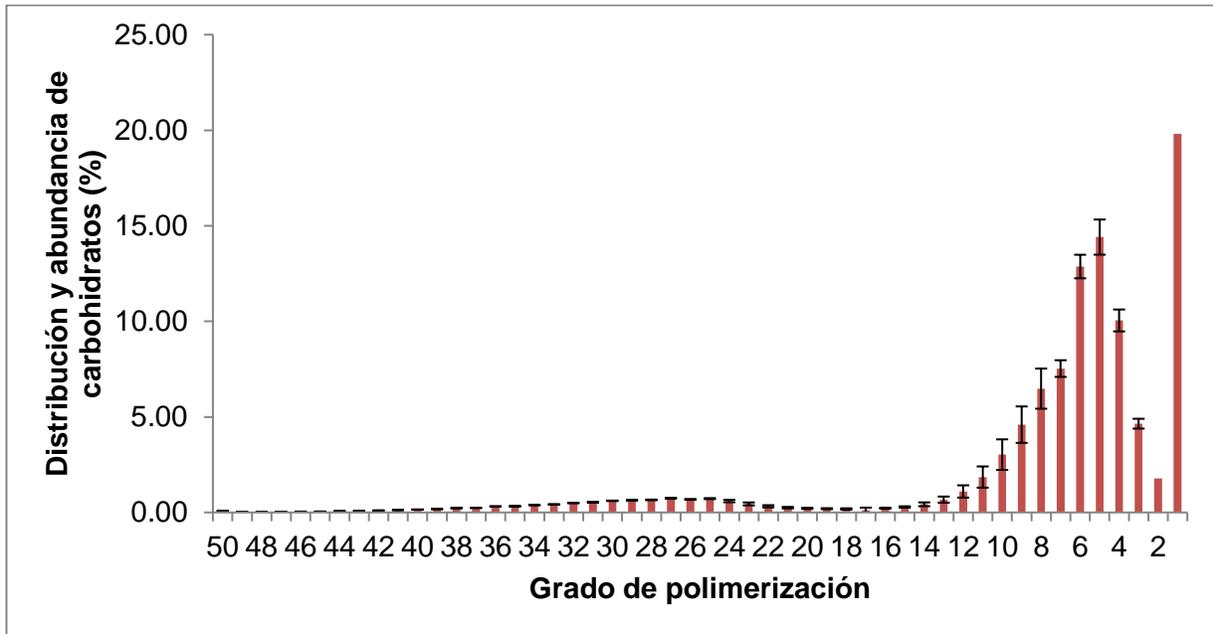
Según los resultados anteriores, se destaca una alta proporción de fructooligosacáridos de cadena corta en la hoja de agave, lo cual es muy interesante por el potencial que tienen en la salud como prebióticos, enriqueciendo la microbiota intestinal y mejorando en los problemas gastrointestinales (López & Mancilla-Margalli, 2007) así como posibles sustratos para la fermentación láctica, objeto de esta tesis. Es importante destacar que el tamaño de los carbohidratos varía significativamente entre la punta y la base. En la punta, los carbohidratos con un grado de polimerización (GP) de 5, 4 y 3 son más abundantes, mientras que en la base predominan los carbohidratos con un GP de 6, los cuales no se encuentran en la punta.

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Praznik *et al.* (2013) dónde analizaron hojas de *Agave tequilana* Weber, var. *Azul* con gran abundancia de fructooligosacáridos de bajo peso molecular (GP <10). Además, los cromatogramas de SEC indicaron al menos 14 fracciones de FOS con diferentes GP.

Por otro lado, en el análisis de la distribución de carbohidratos realizado por Alvarado *et al.*, (2014) se encuentra que en la piña hay una abundancia distinta a las hojas ya que en esta matriz abundan monosacáridos, y una baja cantidad de fructooligosacáridos. Siendo motivo de estudio en la biosíntesis de fructooligosacáridos (Sandoval-González *et al.*, 2018; Domínguez *et al.*, 2012). Por esta razón, el uso de las hojas como un subproducto las hace muy interesantes para diversas áreas, incluyendo la fermentación láctica ya mencionada.



(a)



(b)

Fig. 22 Distribución y abundancia de carbohidratos presentes en el jugo de la hoja de agave: (a) punta y (b) base

9.17 Fermentación láctica en las fracciones de la hoja del agave

En la **Fig. 23** se muestra el crecimiento de *L. paracasei* DG8, la cepa que obtuvo los mejores resultados en los experimentos previos. Esta bacteria ácido láctica (BAL) demostró su capacidad para crecer en el jugo de la hoja de agave, alcanzando un mejor rendimiento en la punta (3.88 g/L) en comparación con la base (1.67 g/L) después de 5 días de fermentación.

De manera similar, en un estudio realizado por Gallardo-Martínez (2023), se evaluó el crecimiento de otra BAL, *E. faecium* DG9, en jugo de hoja de agave. En dicho trabajo, se reportó un crecimiento de 3.6×10^4 UFC/mL, evidenciando la viabilidad de este sustrato como medio de cultivo para diferentes cepas de BAL.

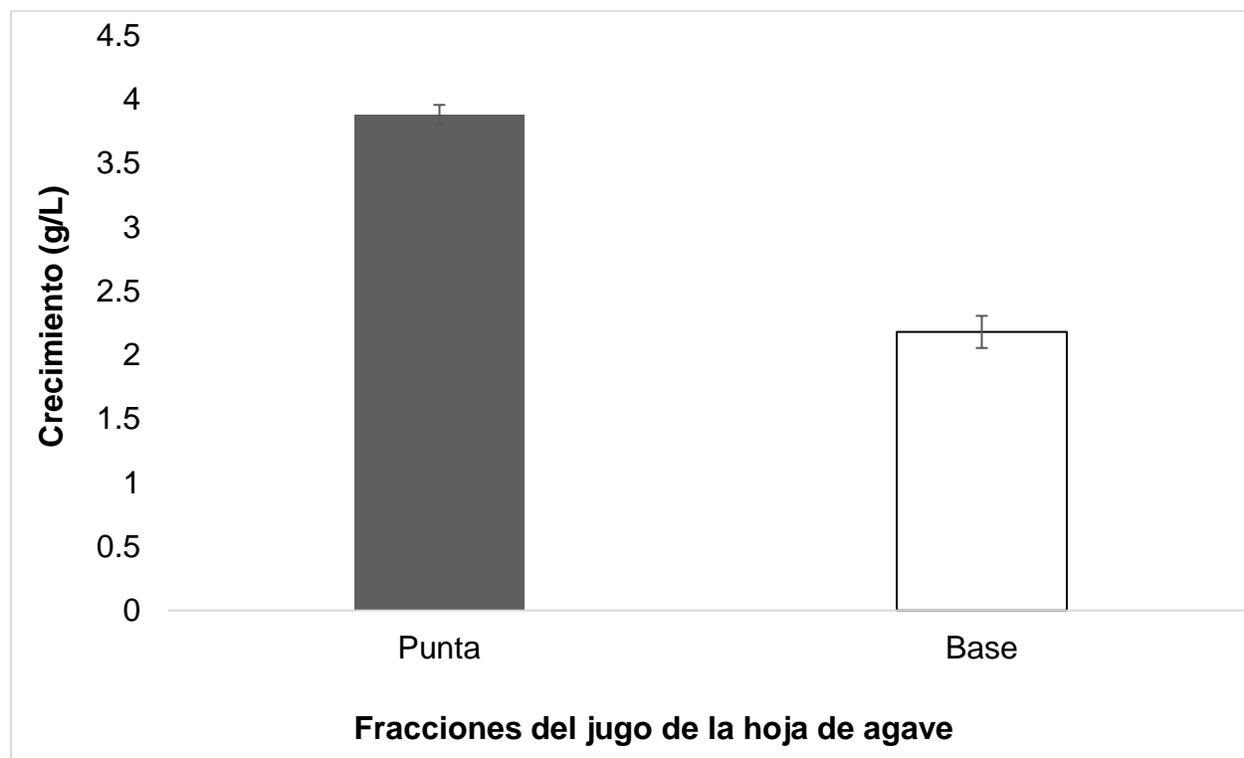


Fig. 23 Crecimiento de DG8 en las dos fracciones del jugo de agave después de 120 h de fermentación con un $\text{pH} = 5.2 \pm 0.3$ y azúcares totales = $20 \text{ g/L} \pm 2.13$

De los resultados anteriores, se consideró que el jugo proveniente de la punta de las hojas

podría servir como medio de cultivo para la producción de AcL a través de un reactor de biopelículas. Es así como en la **Fig. 24** muestra el crecimiento de la cepa DG8 durante 120 h con una fase exponencial acelerada durante el primer día de fermentación y una posterior desaceleración.

Para seguir dicha curva de crecimiento se usó el modelo que se indica a continuación El crecimiento experimental se ajusta al modelo $f(x) = X_{\max} e^{\mu(t-t_0)}$ donde x =biomasa μ =tasa de velocidad específica de crecimiento y t =tiempo. Los parámetros cinéticos son: $(\mu)=0.035$ h⁻¹, tiempo de duplicación (TD)=19.8 h y el rendimiento biomasa sobre sustrato $Y(x/s) = 43.34\%$, el rendimiento coincide con el crecimiento teórico para BAL de 50% como lo describe Wang *et al.*, 2015.

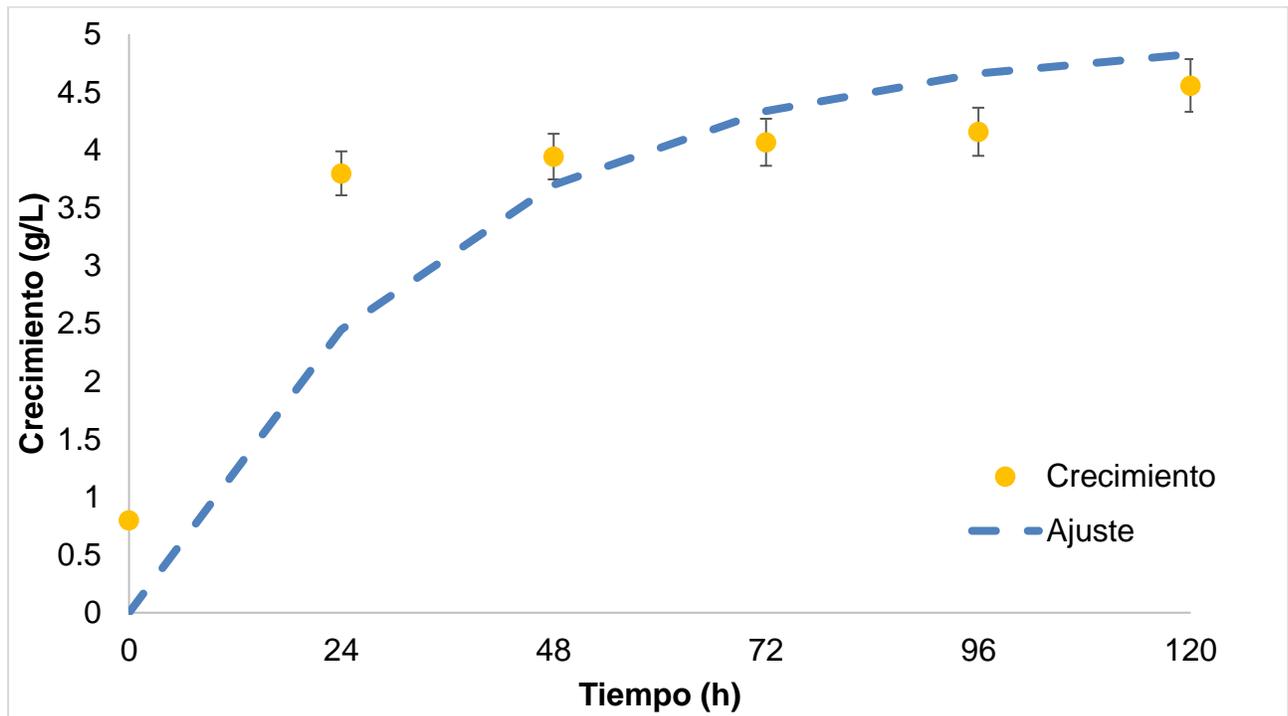


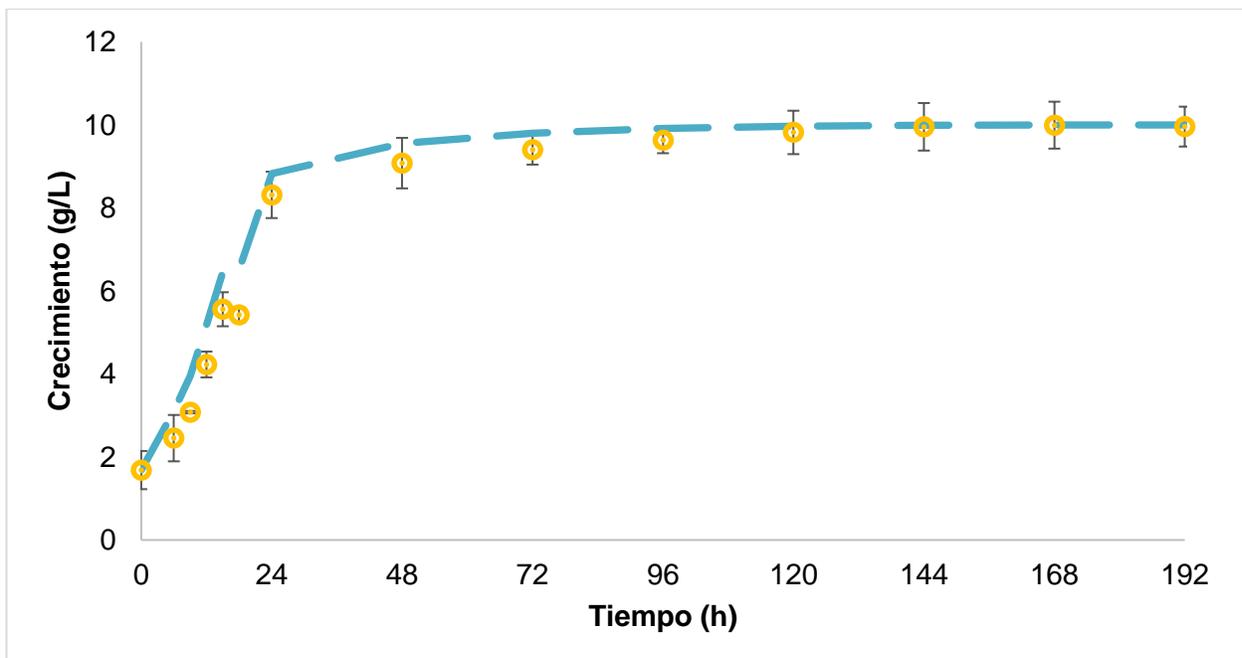
Fig. 24 Cinética de crecimiento de la punta del jugo de la hoja de agave después de 120 h de fermentación. El modelo (----) se ajusta a $(X_m - X_0)(1 - e^{-\mu t}) + X_0$

Para mejorar la fermentación se ajustó el pH inicial a 6.5 y se analizó la cinética de crecimiento hasta 192 h en las dos fracciones (base y punta) para entender el

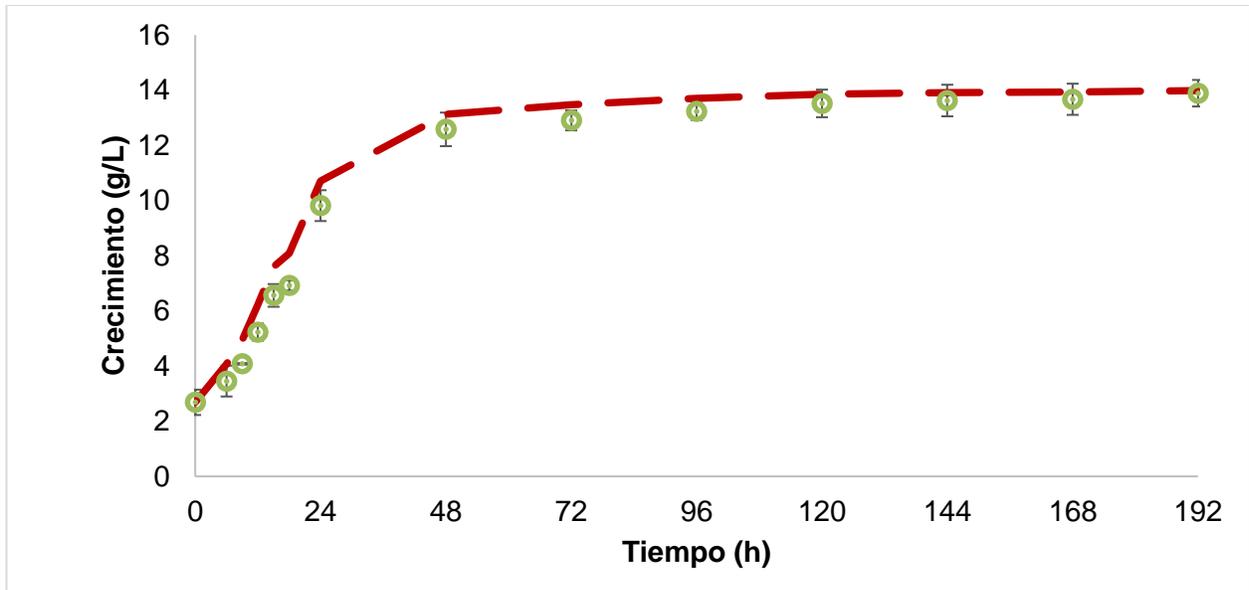
comportamiento de la cepa *L. paracasei* DG8 en un medio complejo como el jugo de la hoja de agave, los resultados se observan en la **Fig. 25**.

En la **Fig. 25a** se reporta el crecimiento de la bacteria, los puntos representan los datos experimentales, y la línea discontinua representa un ajuste o modelo del crecimiento bacteriano dado por la siguiente ecuación $(X_m - X_0)(1 - e^{-\mu t}) + X_0$. Los puntos experimentales muestran como el crecimiento aumentó en el tiempo de 0 a 24 h y luego se estabilizó, indicando que las BAL alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento a las 48 h.

En la Fig. 25 b se muestra que el crecimiento celular en función del tiempo. Los puntos representan los datos experimentales, mientras que la línea discontinua muestra una tendencia o ajuste de los datos. Los resultados indican que la fase exponencial se encontró entre las 0 a las 48 h, dónde el $X_{Max} = 13$ g/L.



(a)



(b)

Fig. 25. Cinéticas de crecimiento de las dos fracciones de jugo de la hoja de agave a) punta y b) base durante 192 h de fermentación. El modelo (----) se ajusta a $(X_m - X_0)(1 - e^{-\mu t}) + X_0$

En la **Fig. 26** se observa la producción de AcL con respecto al consumo de carbohidratos en un periodo de tiempo de 0 a 192 h ambos comportamientos se ajustan a los modelos propuestos para consumo $S(t) = (S_0 - S_f)e^{-kt} + S_f$ dónde S= azúcares totales, k= tasa de velocidad específica de consumo y t=tiempo y para el producto es $P(t) = (P_{max})e^{-qt}$, dónde P_{max} =máximo producto alcanzado, q= tasa específica de producto y t = tiempo.

En la fracción correspondiente a la punta (**Fig. 26a**), la eficiencia de conversión del sustrato en AcL ($Y_{p/s}$) fue del 95.35%, lo que indica que casi la totalidad del sustrato consumido se transformó en AcL. Otros parámetros evaluados incluyen un consumo de sustrato de 14 g/L, un rendimiento de biomasa respecto al sustrato del 53.8%, una tasa de velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} y una constante de afinidad por el sustrato de 0.045.

Por otro lado, en la **Fig. 26b**, la $Y_{p/s}$ fue del 61%, lo que significa que una menor proporción

del sustrato consumido se convirtió en AcL. En este caso, el consumo de sustrato fue de 18 g/L, con un rendimiento de biomasa respecto al sustrato del 55%, una tasa de velocidad específica de crecimiento de 0.02 h^{-1} y una constante de afinidad por el sustrato de 0.04.

Estos resultados destacan que la fracción del jugo proveniente de la punta es más eficiente como medio para la producción de AcL. Esto abre posibilidades para el desarrollo de procesos industriales utilizando jugo de hojas residuales de agave como materia prima, en sustitución de glucosa o sacarosa como insumos principales en la producción.

El uso del jugo de la hoja de agave como sustrato para la producción de AcL ofrece numerosas ventajas. En primer lugar, es una materia prima fácilmente disponible. Además, no enfrenta restricciones significativas, ya que su huella hídrica es considerablemente menor en comparación con la industria del AcL que utiliza insumos como el maíz o la caña de azúcar (Davis *et al.*, 2017; Acuña, 2022).

En la **Tabla 8** se comparan las tasas de velocidad específicas de crecimiento (μ , h^{-1}) observadas durante la fermentación del jugo de las hojas de agave de la base y la punta, presentadas en esta tesis, con las tasas de otras cepas cultivadas en el medio MRS suplementado con fructanos comerciales. Es notable la similitud de los resultados obtenidos por Martha-Lucero (2018) y Morales-Landa *et al.* (2024), cercanos a $\mu=0.3 \text{ h}^{-1}$, ya que estos últimos son 20 veces mayores que los del jugo de hoja de agave. Esto sugiere que en el jugo de agave podría haber una escasez de factores de crecimiento (proteínas y vitaminas) o la presencia de factores inhibitorios (saponinas).

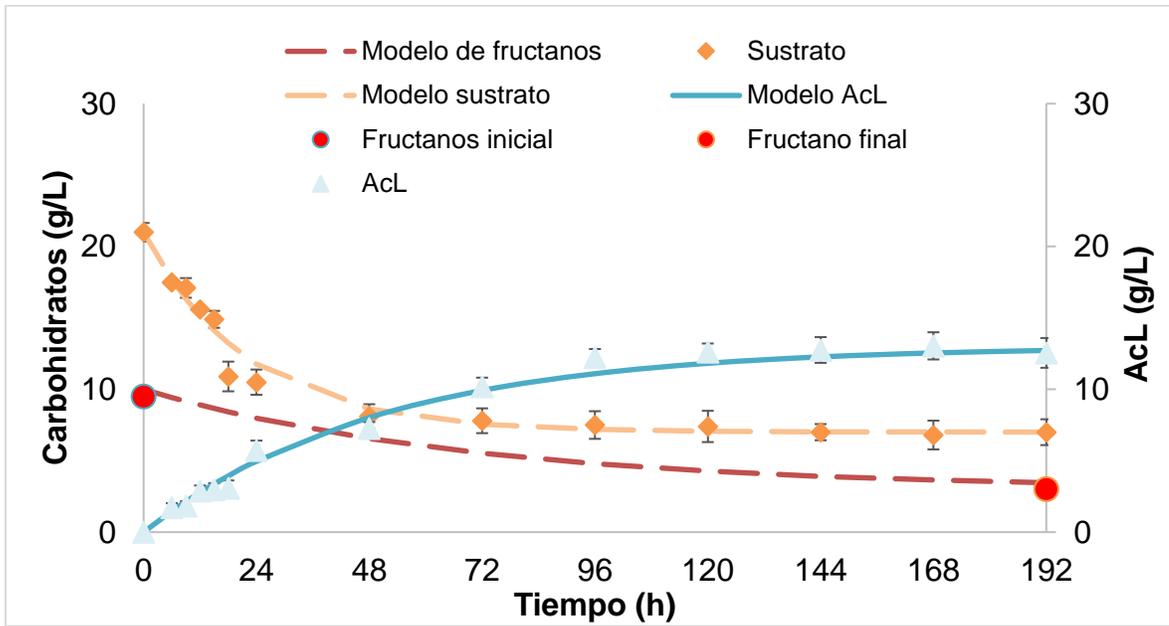
Sin embargo, se observó una alta concentración de biomasa, alrededor de 13 g/L, y las concentraciones iniciales de carbohidratos estaban alrededor de 20 g/L. Estudios de otros autores han demostrado que los fructanos se degradan hasta en un 80% (Martha-Lucero, 2018). De los datos presentados en la **Fig. 26**, podemos inferir que el rendimiento de este tipo de fermentación es elevado ($Y_{p/s} = 0.92$). Por lo tanto, se requiere la optimización del acondicionamiento del agave para que los tiempos de fermentación sean similares a los obtenidos con fructanos purificados en el medio MRS. Esto quedó fuera del alcance de esta tesis debido a limitaciones de tiempo y recursos.

No obstante, es pertinente aclarar que la fermentación láctica del jugo de agave podría ser de interés para fermentaciones artesanales, ya que su bajo nivel de inversión en equipo y control de procesos podría resultar lucrativo para ofrecer bebidas nutracéuticas en distintas regiones del país. Las fermentaciones tradicionales, como el tepache y el pulque, requieren procesos relativamente lentos. Por ejemplo, la fermentación tradicional en los tinacales demora más de 2 semanas, según observaciones propias. Esta observación puede ser útil para los pequeños productores de agave pulquero que buscan usos alternativos para los derivados de las hojas de agave.

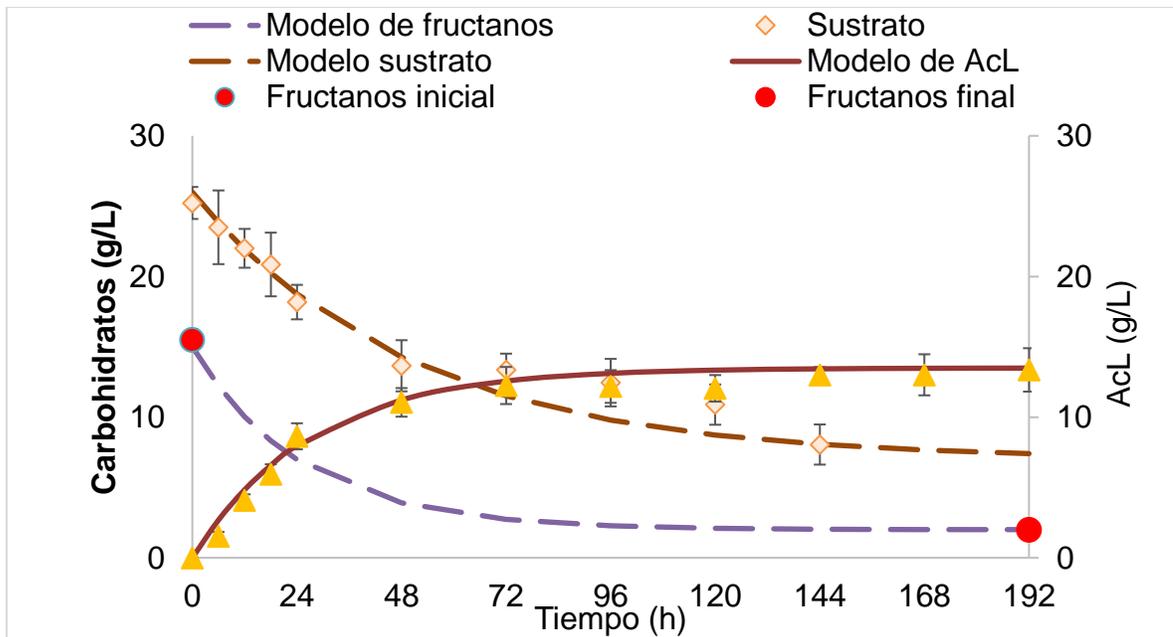
Tabla 8. Análisis comparativo de las velocidades y crecimiento máximo de BAL en fructanos de agave y en jugo de agave

Materia prima	μ (h ⁻¹)	X _{max}	Cepa	Referencia
Jugo de punta de la hoja	0.015	10 g/L	<i>L. paracasei</i> DG8	Esta tesis
Jugo de base de la hoja	0.02	13 g/L	<i>L. paracasei</i> DG8	Esta tesis
MRS + fructanos	0.34	1.55E+09 UFC/ mL	<i>L. delbrueckii</i> <i>bulgaricus</i>	Martha-Lucero, 2018
MRS + fructanos	0.21	3.90E+08 UFC/ mL	<i>L. casei</i>	Martha-Lucero, 2018
MRS + fructanos	0.32	NR*	<i>L. paracasei</i>	Morales-Landa <i>et al.</i> , 2024
MRS + fructanos	0.68	NR*	<i>L. rhamnosus</i>	Morales-Landa <i>et al.</i> , 2024

*NR: No reportado



a)



b)

Fig. 26 *Parámetros cinéticos de la fermentación del jugo de la hoja de agave con la bacteria DG8. a fracción de la punta y b fracción de la base*



9.18 Formación de biopelículas con el jugo de agave

En la **Fig. 27** se observa la formación de biopelículas aprovechando el jugo de la hoja de agave, encontrando que al utilizar el jugo de la fracción de la punta o la base para la formación de biopelículas de la cepa *L. paracasei* DG8 no se logra formar biopelículas. Como posible factor negativo se consideró a la presencia de saponinas que se sabe tienen un efecto inhibitorio en el metabolismo celular por su intercalación en las membranas de las células (Cira *et al.*, 2008).

Se desarrolló un pretratamiento de eliminación mecánica de saponinas en el cual, por medio de la agitación se produjo espuma que fue eliminada, de acuerdo con Gongora *et al.* (2022) un rasgo característico de las saponinas es la producción de espuma. Este proceso permitió la disminución de saponinas en la punta y base de $46.78 \pm 3.11\%$ y $48.11 \pm 2.6\%$, respectivamente (**Tabla 9**). En la **Fig. 28** se observa colorimétricamente la disminución de la intensidad del color de los tubos con saponinas, demostrando la eficiencia de la eliminación de las saponinas del jugo de agave.

La disminución de saponinas favoreció la formación de biopelículas con una $DO = 0.379 \pm 0.02$ en punta y una $DO = 0.223 \pm 0.05$ en la base. Con este análisis se puede inferir que las saponinas tienen un efecto negativo en la formación de biopelículas. Esto puede sustentarse con lo reportado en Rui *et al.*, 2017 quienes señalan que las saponinas interactúan con la membrana celular aumentando la porosidad y provocando un desequilibrio osmótico. Además, Luo *et al.*, 2024 mencionan que existen cambios significativos en el metabolismo de *L. casei* BYglAB01 y *L. delbrueckii* BYbjAD01 en

presencia de saponinas.

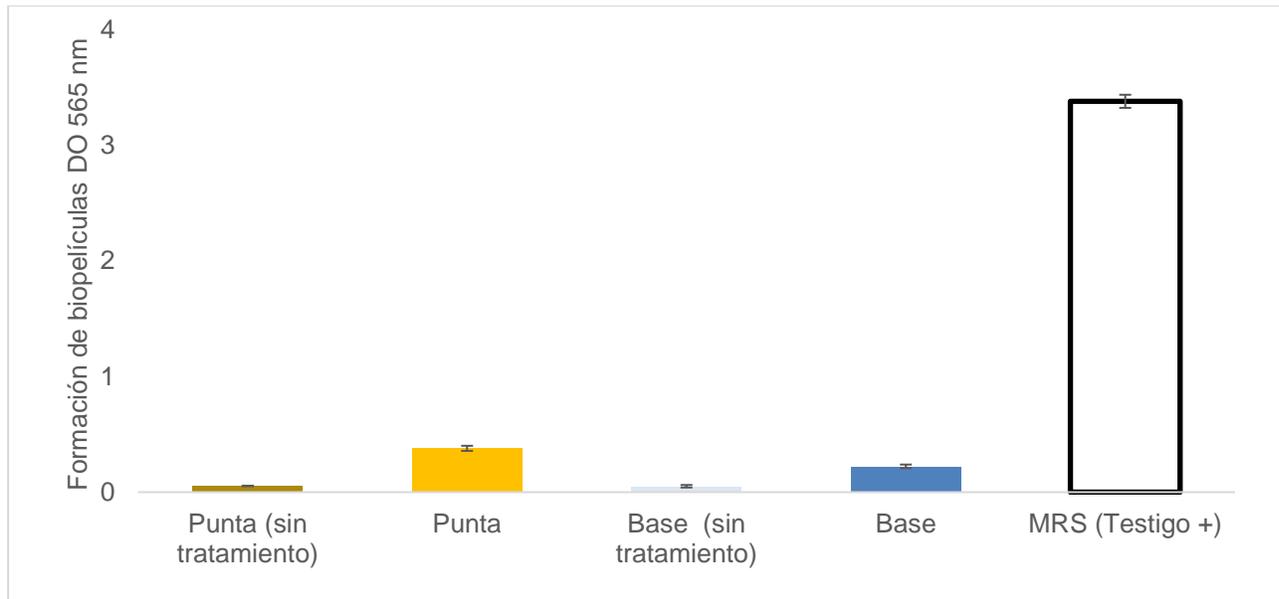


Fig. 27. Formación de biopelícula en el jugo de la hoja de agave en la fracción de la punta y base utilizando *L. paracasei* DG8. La punta y base con saponinas se refiere a que el jugo se aprovechó directamente y las que fueron con tratadas se mencionan sin saponinas. En una fermentación de 5 días en microplacas de poliestireno. La capacidad de formar biopelículas se define de acuerdo con la DO como: baja: 0 a 0.499; media: 0.5 a 1.499; alta: >1.5.

Tabla 9. Reducción de saponinas en las fracciones del jugo de agave

Fracción de hoja de agave	Saponinas	Reducción de saponinas
Punta	0.05 ±0.026	0.02339 ±3.11
Base	0.1 ±0.036	0.048 ±2.6

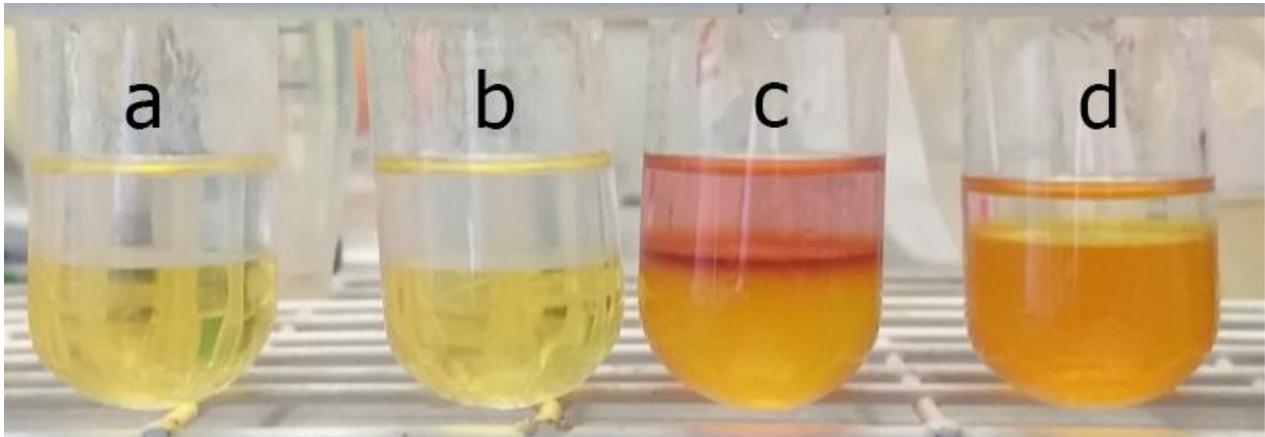


Fig. 28 *Disminución de saponinas en el jugo de agave mediante el método de Salkowski. Se representa el jugo de la hoja de agave después del tratamiento para la disminución de saponinas en (a) la punta y (b) la base. Los tubos (c) y (d) representan el jugo sin tratamiento en la punta y la base, respectivamente*

10. Cumplimiento de objetivos de la tesis

En la Tabla 10 se muestra el cumplimiento de los objetivos propuestos al inicio de la tesis.

Tabla 10. *Cumplimiento de objetivos*

Objetivo	Cumplimiento
Seleccionar cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de agave para la producción de exopolisacáridos (EPS) utilizando fructanos comerciales de agave, fructosa y glucosa como fuentes de carbono.	En la sección 9.5 se describió que la mayor productora de EPS fue la cepa DG8 con glucosa. Asimismo, las 9 cepas aisladas de agave produjeron EPS a partir de fructanos de agave.
Analizar la formación de biopelículas en soportes bajo diferentes condiciones de fuentes de carbono, pH, tiempo, distintas relaciones carbono: nitrógeno (C: N) y distintos tiempos.	En la sección 9.8 se demostró que los fructanos de agave fueron la mejor fuente de carbono para la formación de biopelículas. Asimismo, se encontró que para la cepa DG8, las mejores condiciones para la formación de biopelículas fueron: un pH de 6.5 (sección 9.9), una concentración de 30 g/L de fructanos de agave (sección 9.10), un tiempo de fermentación de 5 días (sección 9.11) y una combinación de extracto de levadura, carne y peptona (sección 9.12).

<p>Emplear biopelículas para la producción de AcL mediante fermentaciones líquidas con ciclos repetitivos.</p>	<p>En la sección 9.13 se observó que la producción de AcL se triplicó al utilizar las biopelículas de la cepa DG8, las cuales demostraron ser viables durante 14 días.</p>
<p>Evaluar la eficiencia en la producción de AcL empleando el jugo de la hoja de agave como sustrato con la cepa <i>Lacticaseibacillus paracasei</i> DG8.</p>	<p>En la sección 9.17 se observó que la Y p/s superó el 90%. Sin embargo, la tasa de velocidad específica de crecimiento fue inferior a la reportada con el medio MRS con fructanos.</p>
<p>Examinar la formación de biopelículas utilizando el jugo de la hoja de agave como única fuente de nutrientes, sin la adición de compuestos externos.</p>	<p>En la sección 9.18 se logró la formación de biopelículas al reducir la concentración de saponinas en el jugo de la hoja de agave.</p>

11. Conclusiones

- Es factible formar biopelículas de manera eficiente utilizando BAL aisladas de agave, específicamente, *L. paracasei* DG8, que demostró ser la cepa más eficiente. Las condiciones ideales incluyeron, el uso de fructanos comerciales de agave como principal fuente de carbono, combinaciones de proteínas como extracto de levadura, peptona y extracto de carne como fuentes de nitrógeno, un pH inicial de 6.5 y un tiempo de fermentación de 5 días. Además, es viable reutilizar estas biopelículas adheridas a perlitas de polipropileno para transformar los fructanos en AcL, lo que apoya el desarrollo de futuros reactores de tipo continuo para esta fermentación.
- El jugo de agave contiene los nutrientes necesarios para que las BAL transformen los fructanos en AcL con un factor de rendimiento elevado (Y p/s=95%). Aunque con tasas de

velocidad de crecimiento específico bajas ($\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$) en contraste con lo observado en el medio MRS con fructanos ($\mu = 0.3 \text{ h}^{-1}$). Por lo tanto, queda la posibilidad de optimizar las condiciones de dicha fermentación. Además, se encontró que es factible la formación de biopelículas aprovechando el jugo de agave en vez del medio MRS con fructanos comerciales de agave, pero con rendimientos tres veces menores.

- Estos resultados apoyan el uso de residuos agroindustriales para reducir la contaminación ambiental y el aprovechamiento lucrativo de los cultivos de agave en zonas semi desérticas. Sustituyendo así los insumos convencionales de la industria de la fermentación láctica como son: la glucosa o la sacarosa, derivados del maíz o la caña de azúcar, respectivamente.

12. Perspectivas

- En futuros estudios, se sugiere evaluar otros materiales como soporte y explorar estrategias para prolongar la vida útil de las biopelículas, con el objetivo de maximizar su eficiencia en procesos industriales.
- Este estudio analizó las condiciones que favorecen la formación de biopelículas. Futuras investigaciones podrían enfocarse en identificar los genes implicados en este proceso, así como en determinar los factores ambientales que estimulan la expresión de dichos genes. Este conocimiento podría abrir camino a estrategias más precisas para optimizar la formación de biopelículas en contextos industriales.
- Los resultados obtenidos plantean nuevas oportunidades para el uso integral del agave, utilizando el jugo de sus hojas como un medio viable para fermentaciones lácticas y la generación de biopelículas. Sin embargo, es crucial realizar investigaciones adicionales para entender los mecanismos moleculares y metabólicos subyacentes, así como para perfeccionar las condiciones de fermentaciones lácticas continuas que aprovechen el potencial de las biopelículas formadas por BAL, incrementando su viabilidad en aplicaciones a gran escala.

13. Publicaciones

World Journal of Microbiology and Biotechnology (2023) 39:299
<https://doi.org/10.1007/s11274-023-03749-3>

RESEARCH



Biofilm formation by agave epiphytic lactic acid bacteria fed with agave fructans

Nayeli Martha-Lucero¹ · Gustavo Viniegra-González¹ · Luis González-Olivares² · Alma Cruz-Guerrero¹ 

Received: 29 June 2023 / Accepted: 31 August 2023 / Published online: 5 September 2023
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2023

Abstract

The aim of this work was to find out if biofilms can be made by lactic acid bacteria (LAB) isolated from agave plants using agave fructans as sole carbohydrate substrates or if it was necessary to use fructose as a breakdown product of such polymers. This is part of a research project geared to develop industrial lactic acid production from agave fructans, an abundant raw material in Mexico's agave plantations. Present results showed that nine strains of LAB isolated from *Agave salmiana* and belonging to genus *Lacticaseibacillus* and *Enterococcus* produced exopolysaccharides directly from agave fructans to a greater extent than with fructose. The best polysaccharide productions in planktonic cultures were *Lacticaseibacillus paracasei* strains DG2, DG3, DG4 and DG8. Furthermore, all nine LAB strains produced biofilms on polystyrene microplates, much better with agave fructans than with fructose. In most strains, biofilm formation was favored at pH from 6.0 to 6.5, except for strains DG7 and DG9 where pH 5.5 was optimal. Biofilm formation required between 3 and 5 days of incubation in all *Lacticaseibacillus paracasei* strains, whereas *Enterococcus faecium* required a little less of 3 days. Present results support the straight use of agave fructans to develop LAB biofilms using agave epiphytic bacteria. This finding simplifies upstream processing of agave fructans to be used for future lactic acid fermentation in LAB biofilm reactors.

Keywords Agave fructans · Biofilm · *Enterococcus* · Lactic acid bacteria · *Lacticaseibacillus*



14. Referencias

- Acuña, A. P. (2022). *Escasez de agua, disponibilidad y agricultura*. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. <https://www.gob.mx/imta/articulos/escasez-de-agua-disponibilidad-y-agricultura?idiom=es>
- Akoğlu, A. (2020). The effect of some environmental conditions on planktonic growth and biofilm formation by some lactic acid bacteria isolated from a local cheese in Turkey. *Biotechnology Letters*, 42(3), 481–492. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02794-4>
- Alberto, F., Bignon, C., Sulzenbacher, G., Henrissat, B., & Czjzek, M. (2004). The three-dimensional structure of invertase (β -fructosidase) from *Thermotoga maritima* reveals a bimodular arrangement and an evolutionary relationship between retaining and inverting glycosidases. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18903–18910.
- Alcantar-Morales Sarahí Lissete, Ramírez-Ortiz Akari, Gallardo-Martínez Diego, Favela-Torres Ernesto Alma Elizabeth Cruz-Guerrero, Gustavo Viniegra-González. (2024). Kinetics and microbiology of pulp silage from decorticated *Agave salmiana* leaves. *Mexican Journal of Biotechnology*, 15.
- Alcocer, S. H., Corona, C. L., Zapata, J. N., Chen, W., Narbad, A., Wu, W., & Li, H. (2014). Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas. *Metabolites of lactic acid bacteria. Lactic Acid Bacteria in Foodborne Hazards Reduction: Physiology to Practice*, 3, 87–113.
- Alvarado, C., Camacho, R. M., Cejas, R., & Rodríguez, J. A. (2014). Perfil de fructooligosacáridos de agave comerciales empleando ultrafiltración y cromatografía en capa fina de alta resolución. *Revista mexicana de ingeniería química*, 13(2), 417–427.
- Andrabi, S. T., Bhat, B., Gupta, M., & Bajaj, B. K. (2016). Phytase-producing potential and other functional attributes of lactic acid bacteria isolates for prospective probiotic

applications. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 8(3), 121–129.
<https://doi.org/10.1007/s12602-016-9220-3>

Andrade, J. L., De la Barrera, E., Reyes-García, C., Ricalde, M. F., Vargas-Soto, G., & Crevera, J. C. (2007). El metabolismo ácido de las crasuláceas: diversidad, fisiología ambiental y productividad. *Botanical sciences*, 81, 37–50.
<https://doi.org/10.17129/botsci.1764>

Arnauteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *Bacillus subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews. Microbiology*, 19(9), 600–614. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>

Avendaño-Arrazate, C. H., Iracheta-Donjuan, L., Gódinez-Aguilar, J. C., López-Gómez, P., & Barrios-Ayala, A. (2015). Caracterización morfológica de *Agave cupreata*, especie endémica de México. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(1), 148–162.

Avila-Fernández, A., Rendón-Poujol, X., Olvera, C., González, F., Capella, S., Peña-Alvarez, A., & López-Munguía, A. (2009). Enzymatic hydrolysis of fructans in the tequila production process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5578–5585. <https://doi.org/10.1021/jf900691r>

Awad, A. I., & Ahmaed, A. S. (2018). Studying optimum conditions for biofilm production from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of Research in Ecology*, 2185–2191.

Ayala Monter, M. A., Hernández Sánchez, D., Pinto Ruiz, R., González Muñoz, S. S., Bárcena Gama, J. R., Hernández Mendo, O., & Torres Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y *Enterococcus faecium*. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 9(2), 346. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>

Aziz, E., Ashour, M. M. A., & Melad, A. S. (2019). A review on saponins from medicinal plants: chemistry, isolation, and determination. *J. Nanomed. Res*, 7(4), 282–288.



- Aziz, T., Sarwar, A., Ud Din, J., Al Dalali, S., Khan, A. A., Din, Z. U., & Yang, Z. (2021). Biotransformation of linoleic acid into different metabolites by food derived *Lactobacillus plantarum* 12-3 and in silico characterization of relevant reactions. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 147(110470), 110470. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110470>
- Baccou, J. C., Lambert, F., & Sauvaire, Y. (1977). Spectrophotometric method for the determination of total steroidal sapogenin. *The Analyst*, 102(1215), 458–465. <https://doi.org/10.1039/an9770200458>
- Barrientos Rivera, G., Esparza Ibarra, E. L., Segura Pacheco, H. R., Talavera Mendoza, O., Sampedro Rosas, M. L., & Hernández Castro, E. (2019). Caracterización morfológica de *Agave angustifolia* y su conservación en Guerrero, México. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 10(3), 655–668. <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i3.1554>
- Bastarrachea, L. J., Britt, D. W., & Demirci, A. (2022). Development of bioactive solid support for immobilized *Lactococcus lactis* biofilms in bioreactors for the production of Nisin. *Food and Bioprocess Technology*. <https://doi.org/10.1007/s11947-021-02743-7>
- Bermúdez, L., & Sarduy, M. E. G. (2016). Biofilm: a new conception of dentobacterial plaque. *Medicentro*, 20, 167–175.
- Castro-Zavala, A., Juárez-Flores, B. I., Pinos-Rodríguez, J. M., Delgado-Portales, R. E., Aguirre-Rivera, J. R., & Alcocer-Gouyonnet, F. (2015). Prebiotic Effects of *Agave salmiana* Fructans in *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* Cultures. *Natural Product Communications*, 10(11), 1985–1988. <https://doi.org/10.1177/1934578x1501001145>
- Cagno, D., De Angelis, R., Limitone, M., Minervini, A., Carnevali, F., Corsetti, P., & Gobbetti, A. (2006). Glucan and fructan production by sourdough *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 54(26), 9873–

9881.

- Carrero-Puentes, S., Fuenmayor, C., Jiménez-Pérez, C., Guzmán-Rodríguez, F., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., Alatorre-Santamaría, S., García-Garibay, M., & Cruz-Guerrero, A. (2021). Development and characterization of an exopolysaccharide-functionalized acid whey cheese (requesón) using *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Journal of Food Processing and Preservation*.
- Cazzaniga, G., Ottobelli, M., Ionescu, A., Garcia-Godoy, F., & Brambilla, E. (2015). Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. *American Journal of Dentistry*, 28(6), 311–320.
- Chiappe, C. S., Iurlina, M. O., & Saiz, A. I. (2020). Effect of honey phenolic extract on biofilm formation by *Pediococcus pentosaceus* and *Lactobacillus fermentum*. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 131(109782), 109782. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109782>
- Choi, H.-Y., Ryu, H.-K., Park, K.-M., Lee, E. G., Lee, H., Kim, S.-W., & Choi, E.-S. (2012). Direct lactic acid fermentation of Jerusalem artichoke tuber extract using *Lactobacillus paracasei* without acidic or enzymatic inulin hydrolysis. *Bioresource Technology*, 114, 745–747. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.03.075>
- Cira, L. A., González, G. A., Torres, J. C., Pelayo, C., Gutiérrez, M., & Ramírez, J. (2008). Heterologous expression of *Fusarium oxysporum* tomatinase in *Saccharomyces cerevisiae* increases its resistance to saponins and improves ethanol production during the fermentation of *Agave tequilana* Weber var. azul and *Agave salmiana* must. *Antonie van Leeuwenhoek*, 93(3), 259–266. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9200-4>
- Cotton, J. C., Pometto, A. L., 3rd, & Gvozdenovic-Jeremic, J. (2001). Continuous lactic acid fermentation using a plastic composite support biofilm reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(5–6), 626–630. <https://doi.org/10.1007/s002530100820>

- Consejo Regulador del Tequila. (2024). Consumo de agave para Tequila y Tequila 100% de agave. <https://old.crt.org.mx/EstadisticasCRTweb/>
- Cruz-Vasconcelos, S. T., Ramírez-Herrera, C., Cruz-Huerta, N., Gómez-Guerrero, A., & Reyes-Hernández, V. J. (2024). ESTIMULACIÓN DEL DESARROLLO DE HIJUELOS DE RIZOMA DE Agave salmiana MEDIANTE LABORES CULTURALES Y ÁCIDO INDOL-3-BUTÍRICO. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 47(1), 27-27
- Cuny, L., Pfaff, D., Luther, J., Ranzinger, F., Ödman, P., Gescher, J., Guthausen, G., Horn, H., & Hille-Reichel, A. (2019). Evaluation of productive biofilms for continuous lactic acid production. *Biotechnology and Bioengineering*, 116(10), 2687–2697. <https://doi.org/10.1002/bit.27080>
- Daba, G. M., & Elkhateeb, W. A. (2020). Bacteriocins of lactic acid bacteria as biotechnological tools in food and pharmaceuticals: Current applications and future prospects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 28(101750), 101750. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101750>
- Dagher, S. F., Ragout, A. L., Siñeriz, F., & Bruno-Bárcena, J. M. (2010). Cell immobilization for production of lactic acid: biofilms do it naturally. *Advances in applied microbiology*, 71, 113–148.
- Datta, R., & Henry, M. (2006). Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies-a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology: International Research in Process, Environmental & Clean Technology*, 81(7), 1119–1129.
- Davis, S. C., Kuzmick, E. R., Niechayev, N., & Hunsaker, D. J. (2017). Productivity and water use efficiency of Agave americana in the first field trial as bioenergy feedstock on arid lands. *Gcb Bioenergy*, 9, 314–325.
- De Lima, C. P., Días, G. M. P., Soares, M. T. C. V., Bruno, L. M., & Porto, A. L. F. (2020).

Coalho cheese as source of probiotic lactic acid bacteria. *Research, Society and Development*, 9(8), e266984958–e266984958.

De MAN, J. C., Rogosa, M., & Sharpe, M. E. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. *The Journal of Applied Bacteriology*, 23(1), 130–135. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>

De Vuyst, L., & Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23(2), 153–177. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1999.tb00395.x>

Degeest, B., & De Vuyst L. (1999). Indication that the nitrogen source influences both amount and size of exopolysaccharides produced by streptococcus thermophilus LY03 and modelling of the bacterial growth and exopolysaccharide production in a complex medium. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(7), 2863–2870. <https://doi.org/10.1128/AEM.65.7.2863-2870.1999>

Degeest, B., Janssens, B., & De Vuyst, L. (2001). Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis by *Lactobacillus sakei* 0-1: production kinetics, enzyme activities and EPS yields. *Journal of Applied Microbiology*, 91(3), 470–477. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01404.x>

Degeest, B., Mozzi, F., & De Vuyst, L. (2002). Effect of medium composition and temperature and pH changes on exopolysaccharide yields and stability during *Streptococcus thermophilus* LY03 fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 79(3), 161–174. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00116-2)

Delgadillo Ruíz, L., Valenzuela, R., Esparza Ibarra, E. L., Gutiérrez Bañuelos, H., Arellano, F. J., & Muro Reyes, A. (2015). Evaluación del perfil de nutrientes de bagazo de agave como alternativa de alimento para rumiantes. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 6(SPE11), 2099–2103.

- Demirci, A., Kawamura, Y., Sze, G., & Duncan, C. (1995). MR of parenchymal neurocutaneous melanosis. *AJNR. American Journal of Neuroradiology*, 16(3), 603–606.
- Demirci, A., & Pometto, A. L., III. (1995). Repeated-batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(4), 585–589. <https://doi.org/10.1007/bf00164758>
- Demirci, A., Pometto, A. L., & Johnson, K. E. (1993). Lactic Acid production in a mixed-culture biofilm reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 203–207. <https://doi.org/10.1128/aem.59.1.203-207.1993>
- Demirci, Ali, Cotton, J. C., Pometto, A. L., 3rd, Harkins, K. R., & Hinz, P. N. (2003). Resistance of *Lactobacillus casei* in plastic-composite-support biofilm reactors during liquid membrane extraction and optimization of the lactic acid extraction system. *Biotechnology and Bioengineering*, 83(7), 749–759. <https://doi.org/10.1002/bit.10722>
- Demirci, Ali, Pometto, A. L., III, & Johnson, K. E. (1993). Evaluation of biofilm reactor solid support for mixed-culture lactic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(6), 728–733. <https://doi.org/10.1007/bf00167135>
- Dertli, E., Colquhoun, I. J., Gunning, A. P., Bongaerts, R. J., Le Gall, G., Bonev, B. B. B., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2013). Structure and biosynthesis of two exopolysaccharides produced by *Lactobacillus johnsonii* F19785. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(44), 31938–31951. <https://doi.org/10.1074/jbc.m113.507418>
- Diaz, C. (2011). *Descripción de las biopelículas, desarrollo e importancia de su estudio, impacto de las técnicas de micro nano fabricación en sistemas biológicos.*
- Domínguez, A., Nobre, C., Rodrigues, L. R., Peres, A. M., Torres, D., Rocha, I., Lima, N., &

- Teixeira, J. (2012). New improved method for fructooligosaccharides production by *Aureobasidium pullulans*. *Carbohydrate Polymers*, 89(4), 1174–1179. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.091>
- Donot, F., Fontana, A., Baccou, J. C., & Schorr-Galindo, S. (2012). Microbial exopolysaccharides: main examples of synthesis, excretion, genetics, and extraction. *Carbohydrate Polymers*, 87(2), 951–962.
- Doumas, B. T. (1975). Standards for total serum protein assays--a collaborative study. *Clinical Chemistry*, 21(8), 1159–1166. <https://doi.org/10.1093/clinchem/21.8.1159>
- Dubois, A. B., Botelho, S. Y., Bedell, G. N., Marshall, R., & Comroe, J. H., Jr. (1956). A rapid plethysmographic method for measuring thoracic gas volume: a comparison with a nitrogen washout method for measuring functional residual capacity in normal subjects. *The Journal of Clinical Investigation*, 35(3), 322–326. <https://doi.org/10.1172/JCI103281>
- Emanuel, V., Adrian, V., & Diana, P. (2010). Microbial biofilm formation under the influence of various physical-chemical factors. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 24(3), 1993–1996. <https://doi.org/10.2478/v10133-010-0056-9>
- Escamilla-Lozano, Y., García-Garibay, M., López-Munguía-Canales, A., Gómez-Ruiz, L., Rodríguez-Serrano, G., & Cruz-Guerrero, A. (2015). Synthesis of α -fucosidase in different strains of lactic acid bacteria. *Revista mexicana de ingeniería química*, 14(3), 623–629.
- Escamilla-Treviño, L. L. (2012). Potential of plants from the genus agave as bioenergy crops. *Bioenergy Research*, 5(1), 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9159-x>
- Espinosa-Andrews, & Rodríguez-Rodríguez, H. (2018). Water state diagram and thermal properties of fructans powders. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 132(1),

197–204.

- Flores, J., Briones, O., & Andrade, J. L. (2022). Physiological ecology of Mexican CAM plants: history, progress, and opportunities. *Botanical sciences*, 100(Special), S290–S324. <https://doi.org/10.17129/botsci.3107>
- Freire, T. T., Silva, A. L. T. E., Ferreira, B. K. O., & Santos, T. M. II. (2021). Bactérias ácido lácticas suas características e importância: revisão. *Research, Society and Development*, 10(11), e513101119964. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19964>
- Gallardo-Martinez, D. (2023). *Obtención de saponinas esteroidales de Agave salmiana mediante fermentación láctica*. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa.
- Gallardo-Martínez, D., Viniegra-González, G., Figueroa-Martínez, F., Rocha, J., & Cruz-Guerrero, A. (2018). *Isolation and characterization of epiphytic, fructanolytic, homofermentative lactic acid bacteria from Agave salmiana Aislamiento y caracterización de bacterias ácido lácticas epífitas*.
- García-Mendoza, A. J. (2007). Los agaves de Mexico. *Jardín Botánico, Instituto de Biología*, Universidad Nacional Autónoma de México, 87-23.
- García, Y., Boucourt, R., Albelo, N., & Nunez, O. (2007). Inulin fermentation by lactic acid bacteria with probiotic characteristics. *Cuban Journal of Agricultural Science*, 41(3).
- García-Villalba, W. G., Rodríguez-Herrera, R., Ochoa-Martínez, L. A., Rutiaga-Quiñones, O. M., Gallegos-Infante, J. A., & González-Herrera, S. M. (2023). Agave fructans: a review of their technological functionality and extraction processes. *Journal of Food Science and Technology*, 60(4), 1265–1273. <https://doi.org/10.1007/s13197-022-05375-7>
- Góngora Chi, G. J., Lizardi Mendoza, J., López Franco, Y., López Mata, M., & Quihui Cota, L. (2022). Métodos de extracción, funcionalidad y bioactividad de saponinas de

Yucca: una revisión. *Biotecnia*, 25(1), 147–155.
<https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i1.1800>

González, A. I. P. (2019). *Caracterización de los heteropolisacáridos producidos por lactobacillus aislados de sidra natural y de las bacterias productoras: lactobacillus collinoides y lactobacillus sicerae*. Universidad del País Vasco-Euskal Herriko Unibertsitatea.

González-Díaz, Rodríguez-Gómez, R. L., & Cortés-Romero, F. (2020). Exohidrolasas fructosílicas y su importancia en el metabolismo de fructanos en Agave tequilana Weber var. azul. *Revista Colombiana de Química*, 49(3), 3–12.

Grand View Research (2024). *Polylactic acid market size, share & trends analysis report by raw material (corn starch, sugarcane, cassava), by application (rigid thermoform, films & sheets, bottles), by end-use, by region, and segment forecasts, 2024 - 2030*. Grandviewresearch.com. <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/polylactic-acid-pla-market>

Grobben, G. J., Smith, M. R., Sikkema, J., & de Bont, J. A. M. (1996). Influence of fructose and glucose on the production of exopolysaccharides and the activities of enzymes involved in the sugar metabolism and the synthesis of sugar nucleotides in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772. *Applied microbiology and biotechnology*, 46(3), 279–284. <https://doi.org/10.1007/s002530050817>

Grujović, M. Ž., Mladenović, K. G., Nikodijević, D. D., & Čomić, L. R. (2019). Autochthonous lactic acid bacteria-presentation of potential probiotics application. *Biotechnology Letters*, 41(11), 1319–1331. <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02729-8>

Gu, Y., Tian, J., Zhang, Y., Wu, R., Li, L., Zhang, B., & He, Y. (2021). Dissecting signal molecule AI-2 mediated biofilm formation and environmental tolerance in *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.09.015>



- Guan, C., Che, F., Zhou, H., Li, Y., Li, Y., & Chu, J. (2020). Effect of rubusoside, a natural sucrose substitute, on *Streptococcus mutans* biofilm cariogenic potential and virulence gene expression in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(16). <https://doi.org/10.1128/AEM.01012-20>
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Harutoshi, T. (2013). Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. En *Lactic Acid Bacteria - R & D for Food, Health and Livestock Purposes*. InTech.
- Hernández-Rosas, F., Postgraduados, C. de, Castilla-Marroquín, J. D., Loeza-Corte, J. M., Lizardi-Jiménez, M. A., & Hernández-Martínez, R. I. (2021). The importance of carbon and nitrogen sources on exopolysaccharide synthesis by lactic acid bacteria and their industrial importance. *Revista mexicana de ingeniería química*, 20(3), 1–21. <https://doi.org/10.24275/rmiq/bio2429>
- Ho, K. L., Pometto rd, A. L., & Hinz, P. N. (1997). Optimization of L- (+)-lactic acid production by ring and disc plastic composite supports through repeated-batch biofilm fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2533–2542.
- Ho, K. L., Pometto rd, A. L., Hinz, P. N., Dickson, J. S., & Demirci, A. (1997). Ingredient selection for plastic composite supports for L- (+)-lactic acid biofilm fermentation by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Applied and environmental microbiology*, 63(7), 2516–2523.
- Hofvendahl, K., & Hahn-Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources¹. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(2–4), 87–107. [https://doi.org/10.1016/s0141-0229\(99\)00155-6](https://doi.org/10.1016/s0141-0229(99)00155-6)

- Huertas, R. A. P. (2010). Bacterias ácido-lácticas: Papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 8, 93–105.
- Huezcas-Garrido, L., Alanís-García, E., Ariza-Ortega, J. A., & Zafra-Rojas, Q. Y. (2022). Subproductos de interés nutricional y funcional de *Agave salmiana*. *Revista Chilena de Nutricion: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Nutricion, Bromatologia y Toxicologia*, 49(2), 250–262. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182022000200250>
- Jiang, Q., Kainulainen, V., Stamatova, I., Korpela, R., & Meurman, J. H. (2018). *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental oral biofilms exposed to different carbohydrate sources. *Caries Research*, 52(3), 220–229. <https://doi.org/10.1159/000479380>
- Jo, J.-M., Lee, J.-S., Jung, M., & Chung, M.-S. (2021). Effects of soaking treatment on the acrylamide and inulin contents of Jerusalem artichoke tea and its antioxidant activity. *Food Science and Biotechnology*, 30(3), 377–387. <https://doi.org/10.1007/s10068-021-00878-z>
- Joshi, S. R., & Kojiam, K. (2014). Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. *National Academy Science Letters. National Academy of Sciences, India*, 37(1), 59–64. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0203-6>
- Juárez, B. A., Valle, J. R. E., Rodríguez-Ortiz, G., Sánchez, D. G., & Cerero, B. M. (2014). El estado actual de *Agave salmiana* y *A. mapisaga* del Valle de México. *Revista Mexicana de Agroecosistemas*, 1(2), 106–120.
- Kanpiengjai, A., Lumyong, S., Nguyen, T.-H., Haltrich, D., & Khanongnuch, C. (2015). Characterization of a maltose-forming α -amylase from an amyolytic lactic acid bacterium *Lactobacillus plantarum* S21. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, 120, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.010>

- Kansandee, W., Moonmangmee, D., Moonmangmee, S., & Itsaranuwat, P. (2019). Characterization and Bifidobacterium sp. growth stimulation of exopolysaccharide produced by *Enterococcus faecalis* EJRM152 isolated from human breast milk. *Carbohydrate Polymers*, 206, 102–109. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.10.117>
- Kareb, O., & Aider, M. (2020). Quorum sensing circuits in the communicating mechanisms of bacteria and its implication in the biosynthesis of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(1), 5–17. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09555-4>
- Kareem, A. J., & Salman, J. A. S. (2019). Production of dextran from locally lactobacillus spp. isolates. *Reports of Biochemistry & Molecular Biology*, 8(3).
- Karygianni, L., Paqué, P. N., Attin, T., & Thurnheer, T. (2021). Single DNase or proteinase treatment induces change in composition and structural integrity of multispecies oral biofilms. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(4), 400. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040400>
- Kaur, R., Mishra, V., Gupta, S., Sharma, S., Vaishnav, A., & Singh, S. V. (2024). Industrial and environmental applications of plant-derived saponins: An overview and future prospective. *Journal of Plant Growth Regulation*, 43(9), 3012–3026. <https://doi.org/10.1007/s00344-023-11201-x>
- Kawarai, T., Furukawa, S., Ogihara, H., & Yamasaki, M. (2007). Mixed-species biofilm formation by lactic acid bacteria and rice wine yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4673–4676. <https://doi.org/10.1128/AEM.02891-06>
- Khosravi, A., Boldaji, F., Dastar, B., & Torshizi, K. (2018). *Symbiosis between Enterococcus faecium DSM 3530 and fructans compounds of different degree of polymerization: a Preliminary In vitro Assay in a Condition Simulated Chicken Caecum.*

- Kieliszek, M., Pobiega, K., Piwowarek, K., & Kot, A. M. (2021). Characteristics of the proteolytic enzymes produced by lactic acid bacteria. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(7), 1858. <https://doi.org/10.3390/molecules26071858>
- Kierstan, M. P. J. (1978). Production of fructose syrups from inulin-containing plants. *Biotechnology and Bioengineering*, 20(3), 447–450. <https://doi.org/10.1002/bit.260200309>
- Kim, U., Kim, J.-H., & Oh, S.-W. (2022). Review of multi-species biofilm formation from foodborne pathogens: multi-species biofilms and removal methodology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(21), 5783–5793. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1892585>
- Kruk, M., & Trzaskowska, M. (2021). Analysis of biofilm formation on the surface of organic mung bean seeds, sprouts and in the germination environment. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(3), 542. <https://doi.org/10.3390/foods10030542>
- Kubota, H., Senda, S., Nomura, N., Tokuda, H., & Uchiyama, H. (2008). Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(4), 381–386. <https://doi.org/10.1263/jbb.106.381>
- Kumar, L. M., Saad, W. Z., Mohamad, R., & Rahim, R. A. (2017). Influence of biofilm-forming lactic acid bacteria against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA S547). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(12), 1107–1115. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.10.013>
- Kumari, M., Patel, H. K., Kokkiligadda, A., Bhushan, B., & Tomar, S. K. (2022). Characterization of probiotic lactobacilli and development of fermented soymilk with improved technological properties. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science and Technology]*, 154(112827), 112827. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112827>

- Kusmiyati, N., Wicaksono, S. T., & Sukarno, A. S. (2022). Isolation and characterization of probiotic lactic acid bacteria from human breast milk. *Nova biotechnologica et chimica*, e1053. <https://doi.org/10.36547/nbc.1053>
- Lapo Calderón, B. G. (2014). *Estudio de medios de soporte para crecimiento bacteriano aplicado al tratamiento biológico aerobio de aguas residuales*.
- Lebeer, S., Verhoeven, T. L., Vélez, M. P., Vanderleyden, J., & De Keersmaecker, S. C. (2007). Biofilm formation by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG: impact of environmental and genetic factors. *Applied and Environmental Microbiology*.
- LeBlanc, J. G., Levit, R., Savoy de Giori, G., & de Moreno de LeBlanc, A. (2020). Application of vitamin-producing lactic acid bacteria to treat intestinal inflammatory diseases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(8), 3331–3337. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10487-1>
- Leonov, P. S., Flores-Alsina, X., Gernaey, K. V., & Sternberg, C. (2021). Microbial biofilms in biorefinery-Towards a sustainable production of low-value bulk chemicals and fuels. *Biotechnology Advances*, 50.
- Li, Q., Liu, X., Dong, M., Zhou, J., & Wang, Y. (2015). Aggregation and adhesion abilities of 18 lactic acid bacteria strains isolated from traditional fermented food. *Int J Agric Policy Res*, 3(2), 84–92.
- Li, Qing, Loponen, J., & Gänzle, M. G. (2020). Characterization of the extracellular fructanase FruA in *Lactobacillus crispatus* and its contribution to fructan hydrolysis in breadmaking. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(32), 8637–8647. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c02313>
- Liu, Y., Shen, K., Liu, Q., Diao, X., Ma, W., & Liu, G. (2024). Transcriptomics analysis of the mechanism behind *Lactobacillus rhamnosus* Gr18 biofilm formation in an Mn²⁺-deficient environment. *Lebensmittel-Wissenschaft Und Technologie [Food Science*

and Technology], 200(116163), 116163. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2024.116163>

Lluis-Arroyo, Flores-Nájera, D., Cruz-Guerrero, A., Gallardo-Escamilla, A., Lobato-Calleros, F., Jiménez-Guzmán, C., & García-Garibay, J. (2014). Effect of an exopolysaccharide-producing strain of *Streptococcus thermophilus* on the yield and texture of Mexican Manchego-type cheese. *International Journal of Food Properties*, 17(8), 1680–1693.

López, M. G., & Mancilla-Margalli, N. A. (2007). The nature of fructooligosaccharides in Agave plants. *Recent Advances in Fructooligosaccharides Research*, 2, 47–67.

López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Díaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from Agave tequilana Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840. <https://doi.org/10.1021/jf030383v>

Lorenzo-Santiago, M. A., Camacho-Ruíz, R. M., García-Hernández, E., Rendón-Villalobos, R., Rodríguez-Campos, J., & Contreras-Ramos, S. M. (2023). Conversion of residual sugars from vinasses to 5-Hydroxymethyl furfural (5-HMF) and phenolic compounds using ion exchange resins and thermal treatment. *Environmental Technology & Innovation*, 32(103354), 103354. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103354>

Luo, J., Jia, M., Yang, X., Chai, Y., & Bao, Y. (2024). Interaction between lactic acid bacteria and *Polygonatum sibiricum* saponins and its application to microencapsulated co-delivery. *Food Chemistry*, 448, 138959. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.138959>

Maldonado-Barragán, A., Ruiz-Barba, J. L., & Jiménez-Díaz, R. (2009). Knockout of three-component regulatory systems reveals that the apparently constitutive plantaricin-production phenotype shown by *Lactobacillus plantarum* on solid medium is regulated via quorum sensing. *International Journal of Food Microbiology*, 130(1), 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.12.033>



- Manca De Nadra, M. C., Strasser De Saad, A. M., Holgado, A. A., & Oliver, G. (1985). Extracellular polysaccharide production by *Lactobacillus bulgaricus* CRL 420. *Milchwissenschaft*, *40*, 409–411.
- Márquez-Aguirre, A. L., Camacho-Ruiz, R. M., Arriaga-Alba, M., Padilla-Camberos, E., Kirchmayr, M. R., Blasco, J. L., & González-Avila, M. (2013). Effects of Agave tequilana fructans with different degree of polymerization profiles on the body weight, blood lipids and count of fecal *Lactobacilli*/*Bifidobacteria* in obese mice. *Food & Function*, *4*(8), 1237–1244. <https://doi.org/10.1039/c3fo60083a>
- Martha-Lucero, N. A. (2018). *Aprovechamiento de fructanos de agave para la producción de ácido láctico*. Instituto Tecnológico Sonora.
- Martha-Lucero, N., Viniegra-González, G., González-Olivares, L., & Cruz-Guerrero, A. (2023). Biofilm formation by agave epiphytic lactic acid bacteria fed with agave fructans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *39*(11), 299. <https://doi.org/10.1007/s11274-023-03749-3>
- Maske, B. L., de Melo Pereira, G. V., da S Vale, A., de Carvalho Neto, D. P., Karp, S. G., Viesser, J. A., De Dea Lindner, J., Pagnoncelli, M. G., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2021). A review on enzyme-producing lactobacilli associated with the human digestive process: From metabolism to application. *Enzyme and Microbial Technology*, *149*(109836), 109836. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109836>
- Makras, L., Van Acker, G., & De Vuyst, L. (2005). *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(11), 6531–6537. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.11.6531-6537.2005>
- Maunatin, A., Harijono, H., Zubaidah, E., & Rifai, M. (2020). The isolation of exopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from lontar (*Borassus flabellifer* L.)

sap. *Iranian Journal of Microbiology*, 12(5).

- Maurya, A. K., & Manik, G. (2023). Advances towards development of industrially relevant short natural fiber reinforced and hybridized polypropylene composites for various industrial applications: a review. *Journal of Polymer Research*, 30(1). <https://doi.org/10.1007/s10965-022-03413-8>
- Mayer, M. J., D'Amato, A., Colquhoun, I. J., Le Gall, G., & Narbad, A. (2020). Identification of genes required for glucan exopolysaccharide production in *Lactobacillus johnsonii* suggests a novel biosynthesis mechanism. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(8). <https://doi.org/10.1128/AEM.02808-19>
- McCleary, B. V., Charmier, L. M. J., McKie, V. A., McLoughlin, C., & Rogowski, A. (2019). Determination of fructan (inulin, FOS, Levan, and branched fructan) in animal food (animal feed, pet food, and ingredients): Single-laboratory validation, first action 2018.07. *Journal of AOAC International*, 102(3), 883–892. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0330>
- Mendoza, A. G. (2007). *Los agaves de México* (Universidad Autónoma de México, Ed.). Ciencias 87.
- Mıdık, F., Tokatlı, M., Bağder Elmacı, S., & Özçelik, F. (2020). Influence of different culture conditions on exopolysaccharide production by indigenous lactic acid bacteria isolated from pickles. *Archives of Microbiology*, 202(4), 875–885. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01799-6>
- Miller, G. L. (1959a). Modified DNS method for reducing sugars. *Anal Chem*, 31(3), 426–428.
- Miller, G. L. (1959b). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426–428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Mir, M. A., Parihar, K., Tabasum, U., & Kumari, E. J. J. M. P. S. (2016). Estimation of



- alkaloid, saponin and flavonoid, content in various extracts of *Crocus sativa*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(5), 171–174.
- Monsan, P., Bozonnet, S., Albenne, C., Joucla, G., Willemot, R.-M., & Remaud-Siméon, M. (2001). Homopolysaccharides from lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 11(9), 675–685. [https://doi.org/10.1016/s0958-6946\(01\)00113-3](https://doi.org/10.1016/s0958-6946(01)00113-3)
- Montañez-Soto, Venegas-González, J., Vivar-Vera, J., & Ramos-Ramírez, M. (2011). Extracción, caracterización y cuantificación de los fructanos contenidos en la cabeza y en las hojas del Agave tequilana Weber azul. *Bioagro*, 23(3), 199–206.
- Mora-Villalobos, J. A., Montero-Zamora, J., Barboza, N., Rojas-Garbanzo, C., Usaga, J., Redondo-Solano, M., Schroedter, L., Olszewska-Widdrat, A., & López-Gómez, J. P. (2020). Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. *Fermentation*, 6(1), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010023>
- Morales-Landa, J. L., Moreno-Vilet, L., Cordero-Quiñones, L. M., González-Montemayor, J. A., García-Fajardo, J. A., & Luiz-Santos, N. (2024). Effect of the molecular structure and degree of polymerization of fructans on the growth behavior of four lactic acid bacteria. *ACS Food Science & Technology*, 4(8), 1929–1936. <https://doi.org/10.1021/acsfoodscitech.4c00251>
- Morán-Velázquez, D. C., Maceda-López, L. F., Rodríguez-López, L., Vilaplana, F., & Alatorre-Cobos, F. (2023). Identificación de genes involucrados en la biosíntesis de componentes de fibras y su posible uso como marcadores de selección. En A. G. M. y A. C. G. M. Rosa Maria Camacho (Ed.), *Los agaves y sus derivados*.
- Mousavi, Z. E., Mousavi, S. M., Razavi, S. H., Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. (2011). Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(1), 123–128. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0436-1>

- Muruzović, M. Ž., Mladenović, K. G., & Čomić, L. R. (2018). In vitro evaluation of resistance to environmental stress by planktonic and biofilm form of lactic acid bacteria isolated from traditionally made cheese from Serbia. *Food Bioscience*, 23, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.03.005>
- Muscariello, L., Marasco, R., De Felice, M., & Sacco, M. (2001). The functional ccpA gene is required for carbon catabolite repression in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), 2903–2907. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.2903-2907.2001>
- Nácher-Vázquez, M., Iturria, I., Zarour, K., Mohedano, M. L., Aznar, R., Pardo, M. Á., & López, P. (2017). Dextran production by *Lactobacillus sakei* MN1 coincides with reduced autoagglutination, biofilm formation and epithelial cell adhesion. *Carbohydrate Polymers*, 168, 22–31. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.03.024>
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. (2024). *Compound Summary for CID 612, Lactic Acid*. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactic-Acid>.
- Nava-Cruz, N. Y., Medina-Morales, M. A., Martinez, J. L., Rodriguez, R., & Aguilar, C. N. (2015). Agave biotechnology: an overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(4), 546–559. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923813>
- Ocana, V. S., Bru, E., De Ruiz Holgado, A. A. P., & Nader-Macias, M. E. (1999). Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 45(5), 203–212. <https://doi.org/10.2323/jgam.45.203>
- Ortega Solano, G., Palacios Muñoz, V. H., Rendón Medel, R., & Ramírez Jaspeado, R. (2024). Red de valor del maguey pulquero para la región del Altiplano. *Revista de geografía agrícola*, 73, 37–55. <https://doi.org/10.5154/r.rga.2023.73.3>
- Palomba, S., Cavella, S., Torrieri, E., Piccolo, A., Mazzei, P., Blaiotta, G., Ventrino, V., &

- Pepe, O. (2012). Polyphasic screening, homopolysaccharide composition, and viscoelastic behavior of wheat Sourdough from a *Leuconostoc lactis* and *Lactobacillus curvatus* exopolysaccharide-producing starter culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8), 2737–2747. <https://doi.org/10.1128/AEM.07302-11>
- Parra-Huertas, R. A., Petrov, K., Urshev, Z., & Petrova, P. (2008). I (+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology*, 8(1), 550–557. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2008.02.005>
- Petrov, K., Urshev, Z., & Petrova, P. (2008). L (+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B84. *Food Microbiology*, 25(4), 550–557.
- Petrova, P., Velikova, P., Popova, L., & Petrov, K. (2015). Direct conversion of chicory flour into I (+)-lactic acid by the highly effective inulinase producer *Lactobacillus paracasei* DSM 23505. *Bioresource Technology*, 186, 329–333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.07>
- Petrova, P., Tsvetanova, F., & Petrov, K. (2019). Low cell surface hydrophobicity is one of the key factors for high butanol tolerance of Lactic acid bacteria. *Engineering in Life Sciences*, 19(2), 133–142. <https://doi.org/10.1002/elsc.201800141>
- Petrut, S., Rusu, E., Tudorache, I. S., Pelinescu, D., Sarbu, I., Stoica, I., & Vassu, T. (2019). Influence of various carbon sources on growth and biomass accumulation of some lactic acid bacteria strains. *Revista de Chimie*, 70(7), 2434–2438. <https://doi.org/10.37358/rc.19.7.7356>
- Pinlova, B., Sudheshwar, A., Vogel, K., Malinverno, N., Hischier, R., & Som, C. (2024). What can we learn about the climate change impacts of polylactic acid from a review and meta-analysis of lifecycle assessment studies? *Sustainable Production and Consumption*, 48, 396–406. <https://doi.org/10.1016/j.spc.2024.05.021>

- Piñón-Herrera, M. (2024). *Enriamiento microbiano de la fibra de agave*. Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa.
- Praznik, W., Löppert, R., Cruz Rubio, J. M., Zangger, K., & Huber, A. (2013). Structure of fructo-oligosaccharides from leaves and stem of *Agave tequilana* Weber, var. azul. *Carbohydrate Research*, 381, 64–73. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2013.08.025>
- Pritchard, G. G., & Coolbear, T. (1993). The physiology and biochemistry of the proteolytic system in lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12(1–3), 179–206. [https://doi.org/10.1016/0168-6445\(93\)90063-f](https://doi.org/10.1016/0168-6445(93)90063-f)
- PubChem. (2024). 1-Kestose. Nih.gov. Recuperado el 21 de noviembre de 2024, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/440080>
- Quan, K., Hou, J., Zhang, Z., Ren, Y., Peterson, B. W., Flemming, H. C., & Van Der Mei. (2022). Water in bacterial biofilms: pores and channels, storage, and transport functions. *Critical reviews in microbiology*, 48, 283–302.
- Qureshi, N., Annous, B. A., Ezeji, T. C., Karcher, P., & Maddox, I. S. (2005). Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 24. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-24>
- Raines, C. A. (2003). The Calvin cycle revisited. *Photosynthesis Research*, 75(1), 1–10. <https://doi.org/10.1023/A:1022421515027>
- Ramírez-Pérez, J. I., Álvarez-Gutiérrez, P. E., Luján-Hidalgo, M. C., Ovando-Chacón, S. L., Soria-Guerra, R. E., Ruiz-Cabrera, M. Á., Grajales-Lagunes, A., & Abud-Archila, M. (2022). Effect of linear and branched fructans on growth and probiotic characteristics of seven *Lactobacillus* spp. isolated from an autochthonous beverage from Chiapas, Mexico. *Archives of Microbiology*, 204(7), 364. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02984-w>
- Rangaswamy, V., & Ramakrishna, S. V. (2008). Lactic acid production by *Lactobacillus*

delbrueckii in a dual reactor system using packed bed biofilm reactor. *Letters in Applied Microbiology*, 46(6), 661–666. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2008.02362.x>

Razack, S. A., Velayutham, V., & Thangavelu, V. (2013). Medium optimization for the production of exopolysaccharide by *Bacillus subtilis* using synthetic sources and agro wastes. *Turkish Journal of Biology*, 37(3), 280–288.

Rivera, L. E. C., Ramos, A. P., & Desgarenes, M. D. C. P. (2010). Importance of biofilms in medical practice. *Dermatología Revista Mexicana*, 54(1), 14–24.

Ruas, P., Hugenholtz, J., & Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *International Dairy Journal*, 12(2–3), 163–171.

Rui, X., Wang, M., Zhang, Y., Chen, X., Li, L., Liu, Y., & Dong, M. (2017). Optimization of soy solid-state fermentation with selected lactic acid bacteria and the effect on the anti-nutritional components. *Journal of Food Processing and Preservation*, 41(6), e13290. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13290>

Ruiz-Serrano, E., Serrano-Barquín, H., Serrano-Barquín, C., & Zarza-Delgado, P. (2022). El maíz, vínculo de identidad, sacralidad y cosmogonía mexicana desde el género. *La Colmena*, 113, 61. <https://doi.org/10.36677/lacolmena.v0i113.13779>

Salas, J. A., Escobedo, S., Olivas, G. I., Acosta, C. H., Harte, F., & Sepulveda, D. R. (2021). Method-induced variation in the bacterial cell surface hydrophobicity MATH test. *Journal of Microbiological Methods*, 185.

Sandoval-González, R. S., Jiménez-Islas, H., & Navarrete-Bolaños, J. L. (2018). Design of a fermentation process for agave fructooligosaccharides production using endo-inulinases produced in situ by *Saccharomyces paradoxus*. *Carbohydrate Polymers*, 198, 94–100. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.075>



- Santiago-García, P. A., & López, M. G. (2009). Prebiotic effect of agave fructans and mixtures of different degrees of polymerization from *Agave angustifolia* Haw. *Dynamic Biochemistry. Process Biotechnology and Molecular Biology*, 3(1), 52–58.
- Sapalina, F., & Retnaningrum, E. (2020). Molecular characterization of lactic acid bacteria producing edible biofilm isolated from kimchi. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 21(3).
- Schiraldi, C., Valli, V., Molinaro, A., Carteni, M., & De Rosa, M. (2006). Exopolysaccharides production in *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei* exploiting microfiltration. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 33(5), 384–390. <https://doi.org/10.1007/s10295-005-0068-x>
- Schwab, C., Walter, J., Tannock, G. W., Vogel, R. F., & Gänzle, M. G. (2007). Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(6), 433–443. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2007.03.007>
- Secretaría de economía. (2024). *Acerca de Tequila*. Data Mexico. <https://www.economia.gob.mx/datamexico/es/profile/geo/tequila>
- Seminario, J., Valderrama, M., & Manrique, I. (2003). *El yacón: fundamentos para el aprovechamiento de un recurso promisorio*. International Potato Center.
- Serna-Cock, L., & Stouvenel, A. R. (2005). Producción biotecnológica DE ácido láctico: Estado Del arte biotechnological production of lactic acid: State of the art producción biotecnológica DE ácido láctico: Estado do arte. *Ciencia y Tecnologia Alimentaria*, 5(1), 54–65. <https://doi.org/10.1080/11358120509487672>
- Silos-Espino, G., González-Cortés, N., Carrillo-López, A., Guevaralara, F., Valverde-González, M. E., & Paredes-López, O. (2007). Chemical composition and in vitro propagation of *Agave salmiana* 'Gentry'. *The journal of horticultural science &*

biotechnology, 82(3), 355–359. <https://doi.org/10.1080/14620316.2007.11512242>

Singh, B. P., Ghosh, S., & Chauhan, A. (2021). Development, dynamics, and control of antimicrobial-resistant bacterial biofilms: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(3), 1983–1993.

Slížová, M., Nemcová, R., Mad'ar, M., Hadryová, J., Gancarčíková, S., Popper, M., & Pistl, J. (2015). Analysis of biofilm formation by intestinal lactobacilli. *Canadian Journal of Microbiology*, 61(6), 437–446. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0007>

Sossa, D. P., González, L. M., & Vanegas, M. C. (2009). Aislamiento e identificación de *Lactobacillus* contaminantes en una planta colombiana de fermentación alcohólica. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 12(2), 163–172.

Suárez, A. U. N., Saldaña, T. M., & Velázquez, M. A. J. (2016). El cultivo de maguey pulquero: opción para el desarrollo de comunidades rurales del altiplano mexicano. *Revista de geografía Agrícola*, 56, 33–44.

Suissa, R., Olender, T., Malitsky, S., Golani, O., Turjeman, S., Koren, O., Meijler, M. M., & Kolodkin-Gal, I. (2023). Metabolic inputs in the probiotic bacterium *Lactocaseibacillus rhamnosus* contribute to cell-wall remodeling and increased fitness. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 9(1), 71. <https://doi.org/10.1038/s41522-023-00431-2>

Tafolla-Arellano, J. C., González-León, A., Tiznado-Hernández, M. E., Zacarías García, L., & Báez-Sañudo, R. (2013). COMPOSICIÓN, FISIOLOGÍA Y BIOSÍNTESIS DE LA CUTÍCULA EN PLANTAS. *Revista fitotecnia mexicana*, 36(1), 3. <https://doi.org/10.35196/rfm.2013.1.3>

Taib, N.-A. A. B., Rahman, M. R., Huda, D., Kuok, K. K., Hamdan, S., Bakri, M. K. B., Julaihi, M. R. M. B., & Khan, A. (2023). A review on poly lactic acid (PLA) as a biodegradable polymer. *Polymer Bulletin (Berlin, Germany)*, 80(2), 1179–1213. <https://doi.org/10.1007/s00289-022-04160-y>



- Taylor, K. A. C. C. (1996). A simple colorimetric assay for muramic acid and lactic acid. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 56(1), 49–58. <https://doi.org/10.1007/bf02787869>
- Téllez-Luis, S. J., Moldes, A. B., Alonso, J. L., & Vazquez, M. (2003). Optimization of lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* through response surface methodology. *Journal of Food Science*, 68(4), 1454–1458.
- Tovar-Castro, L., García-Garibay, M., & Saucedo-Castañeda, G. (2008). Lactase production by solid-state cultivation of *Kluyveromyces marxianus* CDBBL 278 on an inert support: effect of inoculum, buffer, and nitrogen source. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 151(2–3), 610–617. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8268-2>
- Unban, K., Chaichana, W., Baipong, S., Abdullahi, A. D., Kanpiengjai, A., Shetty, K., & Khanongnuch, C. (2021). Probiotic and antioxidant properties of lactic acid bacteria isolated from indigenous fermented tea leaves (Miang) of north Thailand and promising application in synbiotic formulation. *Fermentation*, 7(3), 195. <https://doi.org/10.3390/fermentation7030195>
- Valdés-Velasco, L. M., Favela-Torres, E., Théatre, A., Arguelles-Arias, A., Saucedo-Castañeda, J. G., & Jacques, P. (2022). Relationship between lipopeptide biosurfactant and primary metabolite production by *Bacillus* strains in solid-state and submerged fermentation. *Bioresource Technology*, 345(126556), 126556. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.126556>
- Vásquez, S., Milena, H., & Suárez, S. (2009). Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas en la conservación de la carne. *Revista chilena de nutrición*, 36, 64–71.
- Vázquez Díaz, E., García Nava, J. R., Peña Valdivia, C. B., Ramírez Tobías, H. M., & Morales Ramos, V. (2011). Tamaño de la semilla, emergencia y desarrollo de la plántula de maguey (*Agave salmiana* Otto ex Salm-Dyck). *Revista fitotecnia*

mexicana, 34(3), 167–173.

- Veerachamy, S., Yarlagadda, T., Manivasagam, G., & Yarlagadda, P. K. (2014). Bacterial adherence and biofilm formation on medical implants: a review. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 228(10), 1083–1099. <https://doi.org/10.1177/0954411914556137>
- Velázquez, A. C., Pometto, A. L., 3rd, Ho, K. L., & Demirci, A. (2001). Evaluation of plastic-composite supports in repeated fed-batch biofilm lactic acid fermentation by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(4), 434–441. <https://doi.org/10.1007/s002530000530>
- Vera-Peña, M. Y., & Rodriguez-Rodriguez, W. L. (2020). Effect of pH on the growth of three lactic acid bacteria strains isolated from sour cream. *Universitas scientiarum*, 25(2), 341–358. <https://doi.org/10.11144/javeriana.sc25-2.eopo>
- Verma, D., & Subudhi, S. (2021). *Lactobacillus* sp. strain TERI-D3, as microbial cell factory for fermentative production of lactic acid. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*, 4.
- Vink, & Davies, E. T. (2015). Life cycle inventory and impact assessment data for 2014 Ingeo™ polylactide production. *Ind Biotechnol*, 11, 167–180.
- Wang, C., Cui, Y., & Qu, X. (2018). Mechanisms and improvement of acid resistance in lactic acid bacteria. *Archives of Microbiology*, 200(2), 195–201. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1446-2>
- Wang, Yaqi, Wu, J., Lv, M., Shao, Z., Hungwe, M., Wang, J., Bai, X., Xie, J., Wang, Y., & Geng, W. (2021). Metabolism characteristics of lactic acid bacteria and the expanding applications in food industry. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 612285. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.612285>
- Wang, Ying, Tashiro, Y., & Sonomoto, K. (2015). Fermentative production of lactic acid from

- renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 119(1), 10–18.
<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2014.06.003>
- Welman, A. D., & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends in Biotechnology*, 21(6), 269–274.
[https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(03\)00107-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(03)00107-0)
- Xu, X., Luo, D., Bao, Y., Liao, X., & Wu, J. (2018). Characterization of diversity and probiotic efficiency of the autochthonous lactic acid bacteria in the fermentation of selected raw fruit and vegetable juices. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2539.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02539>
- Yao, S., Hao, L., Zhou, R., Jin, Y., Huang, J., & Wu, C. (2022). Multispecies biofilms in fermentation: Biofilm formation, microbial interactions, and communication. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(4), 3346–3375.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12991>
- Yuan, S., Yu, Z., Pan, S., Huang, J., & Meng, F. (2020). Deciphering the succession dynamics of dominant and rare genera in biofilm development process. *The Science of the Total Environment*, 739(139961), 139961.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139961>
- Yuksekdag, Z. N., & Aslim, B. (2008). Influence of different carbon sources on exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (B3, G12) and *Streptococcus thermophilus* (W22). *Brazilian archives of. Biology and Technology*, 51, 581–585.
- Yun, J. S., Wee, Y. J., Ryu, H. W., Yun, J. S., Wee, Y. J., & Ryu, H. W. (2003). Production of optically pure L (+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme and microbial technology*, 33(4), 416–423.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 002/1

Matrícula: 2203802316

Formación de biopelículas de bacterias ácido-lácticas aisladas de agave para la producción de ácido láctico.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 10 del mes de diciembre del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ
DRA. MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS
DR. ERIC ORTEGA SANCHEZ
DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

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

DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA

DE: NAYELI AIME MARTHA LUCERO

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

Aprobar

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



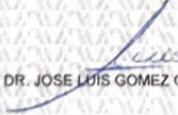
NAYELI AIME MARTHA LUCERO
ALUMNA

REVISÓ



MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS



DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES

PRESIDENTE



DR. GUSTAVO VINIEGRA GONZALEZ

VOCAL



DRA. MONICA ALEJANDRA ROBLES ARIAS

VOCAL



DR. ERIC ORTEGA SANCHEZ

SECRETARIO



DR. LUIS GUILLERMO GONZALEZ OLIVARES

