

16  
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA,



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

CARACTERIZACION DE LA BACTERIOCINA L5  
PRODUCIDA POR *Lactococcus lactis* 5.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A  
ERIKA GRAJALES ESQUIVEL



MEXICO, D. F.

FEBRERO DE 1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

271750



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Vocal	Prof. Hermilo Leal Lara
Secretario	Prof. Celia Barrena González
1 er. Suplente	Prof. Amelia Ma. De G. Farrés González Saravia
2o. Suplente	Prof. Ruth Edith Martin Fuentes

Sitio donde se desarrolló el tema:

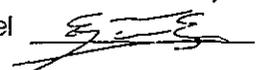
Lab. de microbiología industrial, IIBM, UNAM

Lab. de Bioquímica de macromoléculas, UAM-I

Asesora del tema: Dra. Celia Barrena González

Supervisora técnica: Dra. Edith Ponce Alquicira

Sustentante: Erika Grajales Esquivel





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

ANEXO III

(ACEPTACIÓN DE LA PRUEBA ESCRITA)

SR. DIRECTOR DE LA FACULTAD DE QUÍMICA

Presente.

La prueba escrita desarrollada en la opción:  Tesis  
 Trabajo monográfico de actualización  
 Informe de la práctica profesional

cuyo título es: Caracterización de la bacteriocina L5 producida por  
Lactococcus lactis 5

presentado por: Erika Grajales Esquivel  
de la carrera de: Química de alimentos  
es de aceptarse.

Si es mancomunada, anotar con quién: \_\_\_\_\_

Atentamente,  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

CD. UNIVERSITARIA, D.F., a 26 de febrero

1999.

EL JURADO REVISOR

Biserka Svochtarova Pekarkova  
Prof. Biserka Svochtarova Pekarkova

Amelia Farres González Saravia  
Prof. Amelia Farres González Saravia

Hermilo Leal Lara  
Prof. Hermilo Leal Lara

Ruth Edith Martín Fuentes  
Prof. Ruth Edith Martín Fuentes

Celia Barrera González  
Prof. Celia Barrera González

*Deseo agradecer a Dios por permitirme vivir esta vida y culminar una de mis más preciadas metas, porque una vida donde los Dioses no han sido invitados a participar, no vale la pena vivirla.*

*Papá y Mamá: antes que nada quiero que sepan que estoy infinitamente agradecida por todo su apoyo, su paciencia y su amor. Ustedes dos saben que sin su ayuda incondicional no hubiera sido capaz de alcanzar no solo ésta sino muchas metas más. Quisiera poder abrirme el corazón para que vieran que los quiero mucho mucho Carlos y Altagracia.*

*Para mis hermanos, ustedes saben que siempre fueron un ejemplo para mí, su hermana chiquita. Hoy por fin les puedo decir GRACIAS por todas las lecciones, por las clases de gramática de Carlos, de español de Olivia y las de matemáticas de Clara que tanto me sirvieron para continuar mis estudios con gusto. Y por todas las peleas, los desvelos, las risas, los llantos que nos ayudaron a que estemos hoy aquí.*

*Siempre que me sentía insegura, triste o desalentada estabas ahí. Siempre que necesité ayuda para resolver un problema por pequeño que pareciera estabas ahí. Siempre que lloraba, reía o me enojaba, tu eras el primero en quien pensaba. Hoy que mi alegría es tan grande, estás aquí, Gracias Rodrigo.*

*Quiero agradecer a todas las personas que de alguna u otra forma hicieron posible la realización de esta tesis, en especial a mis asesoras la Dra. Celia Barrera González y la Dra. Edith Ponce Alquicira, porque a pesar de sus múltiples actividades siempre tuvieron un momento para ayudarme a entender cada una de las dificultades que se me presentaron, GRACIAS.*

*Por último quiero agradecer a la Fundación UNAM por la beca otorgada para la realización de esta tesis.*

*Esta tesis se realizó en:*

*El laboratorio de Microbiología Industrial del Depto. de Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM que dirige el Dr. Sergio Sánchez Esquivel*

*El laboratorio de Bioquímica de Macromoléculas del Depto. de Biotecnología de la UAM Unidad Iztapalapa, que dirige la Dra. Isabel Guerrero*

## ÍNDICE GENERAL

A MANERA DE PRÓLOGO.....	I
INTRODUCCIÓN.....	II
1.- ANTECEDENTES.....	1
1.1 Descomposición y conservación de alimentos .....	1
1.2 Aplicaciones de las bacterias lácticas en alimentos .....	6
1.2.1 Metabolismo de los carbohidratos .....	6
1.2.2 Crecimiento en presencia de oxígeno.....	8
2. GENERALIDADES DE LAS BACTERIOCINAS.....	10
2.1 Definición.....	10
2.2 Nomenclatura.....	11
2.3 Clasificación.....	12
2.4 Naturaleza general de las bacteriocinas.....	12
2.5 Naturaleza proteica.....	13
2.5.1 Síntesis.....	13
2.5.2 Composición.....	14
2.5.3 Estructura tridimensional.....	14
2.6 Métodos generales para determinar la actividad de las bacteriocinas.....	14
2.7 Optimización de la producción.....	15
2.8 Modo de acción.....	16
2.8.1 Espectro antimicrobiano.....	16
2.8.2 Modo de acción primario.....	17
2.8.3 Modo de acción secundario.....	20

2.9 Aplicaciones de las bacteriocinas de bacterias lácticas.....	21
2.9.1 Nisina.....	21
2.9.2 Otras aplicaciones de las bacteriocinas.....	22
3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN.....	23
3.1 Una visión general.....	23
3.2 Centrifugación.....	23
3.3 Precipitación por salado.....	25
3.4 Diálisis.....	25
3.5 Cromatografía líquida de alta precisión (HPLC).....	28
3.6 Cromatografía de filtración en gel.....	29
4.JUSTIFICACIÓN.....	31
5. OBJETIVOS.....	31
5.1 Generales.....	31
5.2 Particulares.....	31
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32
6.1 Conservación de Cepas.....	32
6.2 Cinéticas de crecimiento.....	32
6.3 Detección y ensayo de la bacteriocina.....	33
6.4 Selección cruzada.....	34
6.5 Optimización de la producción.....	35
6.6 Purificación parcial de la proteína.....	36
6.7 Actividad bactericida de la bacteriocina L5 parcialmente purificada.....	38
6.8 Caracterización de la bacteriocina parcialmente purificada a factores físicoquímicos como pH y temperatura.....	38

7. RESULTADOS.....	40
7.1 Cinética de Crecimiento.....	40
7.2 Ensayos de mortalidad .....	41
7.3 Optimización de la producción.....	47
7.3.1 Efecto de la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> 5.....	47
7.3.2. Efecto del pH sobre el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> 5.....	49
7.3.2 Efecto del tween 80 sobre el crecimiento de <i>Lactococcus lactis</i> 5.....	51
7.4 Purificación parcial de la proteína.....	54
7.5 Caracterización de la bacteriocina L5 a factores fisicoquímicos como pH y temperatura.....	63
7.6 Actividad bactericida de la bacteriocina L5 parcialmente purificada.....	67
8 DISCUSIÓN.....	70
9 CONCLUSIONES.....	78
10. BIBLIOGRAFÍA.....	79

Anexo I Formulación de medios de cultivo y soluciones

Anexo II Especificaciones del equipo.

Anexo III Tabla de porcentajes de sulfato de amonio para precipitación por salado

Anexo IV Preparación de las membranas de diálisis.

Anexo V Esquema del fermentador New Brunswick de 4 L

Anexo VI Cálculo de peso molecular aparente

## A MANERA DE PROLOGO:

La Química de alimentos está dedicada al desarrollo, optimización y control de productos alimenticios con el mayor valor nutricional y la máxima aceptabilidad, al menor costo y con el nivel de calidad que prolongue la vida útil del alimento y disminuya los riesgos inherentes a su consumo.

Por tanto, la Química de alimentos participa en la atención de las necesidades alimentarias del país, junto con las ciencias agropecuarias (dedicadas a la producción de alimentos primarios) y la ingeniería química de alimentos (dedicada al procesamiento industrial).<sup>1</sup>

El campo de acción de la Química de alimentos es bastante amplio. Incluye el desarrollo de alimentos procesados, desde la materia prima hasta el producto almacenado, además de su comercialización, el diseño y optimización de productos alimenticios y de sus componentes; la asesoría especializada en los aspectos científicos, técnicos y legales del manejo de alimentos: la investigación relacionada con la producción y el desarrollo de alimentos e insumos para éstos, y el aprovechamiento de desechos y subproductos.

Sobra mencionar la importancia que tienen para cualquier país y para cualquier comunidad, la conservación de alimentos. Este aspecto ha sido estudiado desde diversos puntos de vista, incluida la perspectiva de este trabajo.

Sea puesta esta tesis una muestra de lo que es hoy una de las actividades preponderantes de la Química de alimentos en México, la obtención de nueva tecnología para la conservación de alimentos.

E.G.E.

México, DF. febrero de 1999

---

<sup>1</sup> Plan de estudios 1989 Licenciatura en Química de Alimentos. Coordinación Académica de Carreras. Facultad de Química UNAM

## INTRODUCCIÓN.

La descomposición de los alimentos ocurre como resultado de las reacciones químicas relacionadas con el proceso de envejecimiento y deterioro, por la acción de microorganismos, o por ambas cosas. Así, los diversos métodos de conservación de los alimentos tienen el fin de aprovechar los excedentes estacionales de producción de los mismos, mediante la prolongación del periodo en que estos se conservan en buen estado, de manera que se les pueda consumir durante todo el año.

En la actualidad las investigaciones se han centrado en el estudio de conservadores naturales (biopreservadores). Sobre todo en las llamadas bacteriocinas, las cuales constituyen una clase heterogénea de metabolitos de naturaleza proteica, de pesos moleculares, de propiedades bioquímicas, modo de acción y de espectro de actividad diverso. Por definición, las bacteriocinas son inactivadas por al menos una proteasa, por tanto son inactivadas por las enzimas gastrointestinales lo que les confiere la propiedad de ser inocuas. (Nettles y Barefoot, 1993).

Las bacteriocinas no son definidas como antibióticos, pues un antibiótico es usado para tratar alguna enfermedad infecciosa, por lo que está prohibido su uso en alimentos, puesto que esto proporcionaría inmunidad a los microorganismos patógenos. En cambio, la función de las bacteriocinas usadas en alimentos es la de conservar las características fisicoquímicas y sensoriales del producto en el que se empleen.

En estudios previos se había observado que la cepa de *Lactococcus lactis* 5 producía un metabolito con propiedades antimicrobianas, quedando establecido que se trataba de una sustancia del tipo bacteriocina. Resultaba entonces interesante caracterizar a este metabolito con el fin de conocer sus propiedades fisicoquímicas, así como el espectro de actividad que posee, para que de esta manera se pueda elucidar el tipo de alimentos en los cuales su empleo es factible, tomando en cuenta el tipo de microorganismos sobre los cuales podría tener un efecto inhibitorio.

Fue entonces que se plantearon los objetivos de este trabajo. Entre los cuales se incluían: estudiar a la bacteriocina producida por la cepa de *Lactococcus lactis* 5, proveniente del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, así como optimizar su producción y purificarla parcialmente para caracterizar su estabilidad a factores como temperatura y pH, además de determinar su actividad bactericida y establecer su espectro inhibitorio.

A lo largo de la investigación se observó que la bacteriocina L5 es capaz de inhibir a algunas cepas taxonómicamente relacionadas y que su producción óptima es cuando se crece bajo las siguientes condiciones: medio CGB, temperatura: 30 °C, agitación a 200 r.p.m., atmósfera gaseosa de nitrógeno burbujeada a 100 ml/min, pH controlado en 5.5. y la adición al medio de tween 80 al 1.0 %. Además se estableció que la bacteriocina L5 es excretada por la célula productora al medio de cultivo, se precipita a concentraciones de sulfato de amonio del 60 %. Tiene un P.M. mayor de 8 KDa pero menor de 200 KDa, no se adsorbe a la membrana de la célula productora a pH 6.0 y por último se encontró que no es termorresistente (100 °C / 15 min). Su termorresistencia es menor de 40 °C / 15 min a pH 6.0

## 1.- ANTECEDENTES

### 1.1 DESCOMPOSICIÓN Y CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

La descomposición de los alimentos, proceso mediante el cual sufren alteraciones tanto físicas como químicas que los convierte en incomedibles, ocurre principalmente como resultado de tres factores:

a) Los cambios físicos relacionados con la transferencia de masa, en particular la transferencia de agua dentro del alimento, lo que provoca cambios en la textura y la pérdida de sabores por la evaporación de compuestos volátiles.

b) Las reacciones químicas y enzimáticas que ocurren como resultado de los procesos de envejecimiento y deterioro de los alimentos de origen animal o vegetal que consumimos, los cuales están constituidos por compuestos orgánicos. En la planta o en el animal, estos compuestos orgánicos participan en reacciones químicas complejas, cuidadosamente controladas, en la mayoría de los casos, por enzimas propias del metabolismo normal. De esta manera, cuando se cosecha una planta o se sacrifica un animal las enzimas presentes continúan activas y, aunque se pierden los mecanismos de control, son capaces de seguir catalizando reacciones que afectan adversamente la calidad de los alimentos. (Gould, 1990).

c) La descomposición microbiana de los alimentos. Debido a que la presencia de algunos microorganismos en los alimentos es inevitable puesto que los nutrientes que éstos necesitan para su ciclo normal de vida, tales como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, vitaminas, sales minerales y agua, son parte constitutiva de los alimentos que consumimos, la descomposición microbiana del alimento por esta vía resulta inevitable. (Fox, 1992).

Algunos ejemplos de las causas de deterioro en alimentos y sus consecuencias se muestran en la siguiente tabla.

Tabla I. Reacciones de deterioro de los alimentos y sus consecuencias. (Jay, 1978)

TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLO	CONSECUENCIA
Cambios físicos	Pérdida de humedad	Textura seca o correosa
	Exceso de humedad	Hidratación del alimento, remojado, pérdida de la firmeza
	Evaporación	Pérdida de compuestos volátiles, sabores
Reacciones químicas	Oxidación	Rancidez oxidativa Cambios de color
	Reacción de Maillard	Oscurecimiento no enzimático cambios en textura
Actividad enzimática	Polifenol oxidasas	Oscurecimiento enzimático
	Lipoxigenasas	Rancidez
	Lipasas	Rancidez lipolítica
	Proteasas	Cambio de textura Gelificación Cambio en sabores Pérdida de propiedades funcionales
	Amilasas	Cambio de textura Cambio de sabor
Actividad microbiana	Microorganismos de descomposición	Descomposición de los alimentos por bacterias (p. ej. <i>Pseudomonas</i> ) moños, etc.
	Microorganismos toxigénicos	Intoxicación al consumir los alimentos (toxinas de <i>Clostridium botulinum</i> , <i>C. perfringens</i> , <i>B. cereus</i> , <i>St. aureus</i> , etc.)
	Presencia de microorganismos infecciosos	Infección al consumir los alimentos ( <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Salmonella sp.</i> )

Debido a lo anterior, la conservación de los alimentos se fundamenta en la necesidad de aprovechar los excedentes estacionales de producción de los mismos, mediante la

prolongación del periodo en que éstos se conservan en buen estado, de manera que se les pueda consumir durante todo el año, sin que existan reacciones de deterioro.

Existen diversas formas de conservar en buenas condiciones un alimento. Entre ellas se encuentran las siguientes técnicas:

Tabla II. Técnicas de conservación de los alimentos. (Gould, 1990)

OBJETIVO	TÉCNICA O FACTOR	MODO DE ACCIÓN
Inactivación de microorganismos y enzimas	Calor	Pasteurización
		Esterilización comercial
Inactivación de microorganismos	Radiación	Radurización, radicación y radapertización
	Descontaminación gaseosa	Exposición a óxido de etileno
Restricción en el acceso de microorganismos a los productos	Empacado	En lata, plástico, aluminio
	Proceso aséptico	Proceso aséptico térmico Empacado sin contaminación cruzada
Prevención de la oxidación	Uso de antioxidantes	Adición de antioxidantes orgánicos, inorgánicos y enzimáticos
Inhibición del crecimiento de microorganismos	Bajas temperaturas	Almacenamiento en frío y congelación
	Reducción de la actividad acuosa	Secado Curado por adición de sales Adición de azúcares
	Niveles de oxígeno bajos	Empacado al vacío en atmósfera de nitrógeno
	Acidificación	Reducción del pH por adición de ácidos Fermentación láctica, acética
	Incremento en el nivel de etanol	Fermentación alcohólica
	Uso de conservadores antimicrobianos	Adición de conservadores inorgánicos, orgánicos y naturales.

Dentro de las diversas técnicas de conservación ya mencionadas se encuentra la adición de conservadores. El uso de conservadores en alimentos se encuentra legislado por las leyes de cada país. En México el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Control Sanitario de Actividades, Establecimientos, Productos y Servicios, publicada el 18 de enero de 1988 en el Diario Oficial de la Federación, define a un conservador como una sustancia o mezcla de sustancias que previenen, retardan o detienen el proceso de la fermentación, enmohecimiento, putrefacción, acidificación u otra alteración de los alimentos, causados por algunos microorganismos y por algunas enzimas. Sólo se permite el empleo de los que a continuación se indican.

Tabla III. Conservadores permitidos por la Ley General de Salud para ser utilizados en México.

CONSERVADOR PERMITIDO	EJEMPLO DE UTILIZACIÓN
Ácido benzóico, benzoato de sodio	Cerveza, mermelada, crema para ensalada, bebidas sin alcohol, pulpa de fruta, pescado marinado
Ácido sórbico	Refrescos, yogur, queso procesado
Sorbato de sodio, sorbato de potasio	Harina, dulces, pizza congelada
Ácido propiónico, propionato de sodio y calcio	Pan, harinas, dulces
Dióxido de azufre, sulfito de sodio, sulfito ácido de sodio, metabisulfito de sodio, metabisulfito de potasio, sulfito de calcio, sulfito ácido de calcio	Frutas secas, hortalizas deshidratadas, jugos y jarabes de frutas, embutidos y productos lácteos con frutas, sidra, cerveza y vinos. Impide el oscurecimiento de las papas crudas peladas y sirve para acondicionar la masa para galletas.
Metil parabeno Propil parabeno	Cremas, pastas, bebidas, jarabes y otros productos con pH entre 3 y 7
Nisina	Leche fresca, queso fresco, crema cuajada, vinos
Nitrito de potasio, nitrito de sodio, nitrato de potasio, nitrito de sodio	Tocino, jamón, carnes curadas, cecina y algunos quesos

En los últimos años, con el desarrollo de los procesos biotecnológicos, se han realizado muchas investigaciones sobre conservadores de origen natural (bacteriano) que además sean inocuos (Klaenhammer 1988; Nettles y col. 1993).

Así, muchos de los temas de investigación sobre conservadores de origen natural se han centrado en el estudio de las bacteriocinas de bacterias lácticas, sustancias de naturaleza proteica que poseen una actividad bactericida sobre especies taxonómicamente similares y, en algunos casos, sobre un espectro más amplio (Hoover, 1993).

## 1.2 APLICACIONES DE LAS BACTERIAS LÁCTICAS EN ALIMENTOS

Las bacterias lácticas se utilizan en productos consumidos por el hombre desde hace muchos siglos. Los reportes más antiguos que se tienen del consumo de alimentos fermentados con producción de ácido láctico datan del año 8000 a.C. (Knorr, D. 1985).

En la industria de los productos lácteos, las bacterias lácticas juegan un papel muy importante ya que son utilizadas en la elaboración y conservación de leches fermentadas (yogur), quesos madurados, algunos vinos, debido a su perfecta inocuidad higiénica y toxicológica. Por lo regular estas bacterias confieren un sabor agradable a los productos fermentados e inhiben fuertemente el desarrollo de bacterias patógenas o contaminantes.

Debido a que las bacterias lácticas son utilizadas dentro de los procesos biotecnológicos, no es necesario separarlas de los productos finales, lo que suprime las etapas posteriores de purificación que son comúnmente costosas.

El concepto de bacterias ácido lácticas fue desarrollado en los primeros años del presente siglo. El nombre del grupo fue creado a partir de la observación de las bacterias causantes de la fermentación y coagulación de la leche, siendo formalmente definidas en 1919 por Orla-Jensen : “ Las verdaderas bacterias lácticas forman un grupo natural de cocos y bacilos Gram positivos, inmóviles, no esporulados que fermentan azúcares produciendo ácido láctico”.

La clasificación más reciente de bacterias ácido lácticas fue hecha en 1986 por Sneathy y col. y posteriormente ampliada en 1987 por Schleifer. Esta clasificación está basada en sus relaciones filogenéticas e incluye los géneros: *Lactobacillus*, *Lactococcus* (el cual fue propuesto como nuevo género, ya que pertenece a los estreptococos del grupo N), *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*.

### 1.2.1 Metabolismo de los carbohidratos

En 1931, Kluver propuso que las bacterias que fermentaban principalmente la glucosa a ácido láctico fueran llamadas homofermentativas, mientras que las que producían diversos metabolitos se denominaran heterofermentativas.

Las bacterias lácticas homofermentativas utilizan la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) (fig. 1.1) para producir ácido láctico, por lo que dependen de la enzima aldolasa para llevar a cabo su metabolismo normal. Ejemplo de este tipo de bacterias son los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*. No así las heterofermentativas, que utilizan la vía de las pentosas fosfato para producir cantidades equimolares de lactato, etanol y CO<sub>2</sub>.

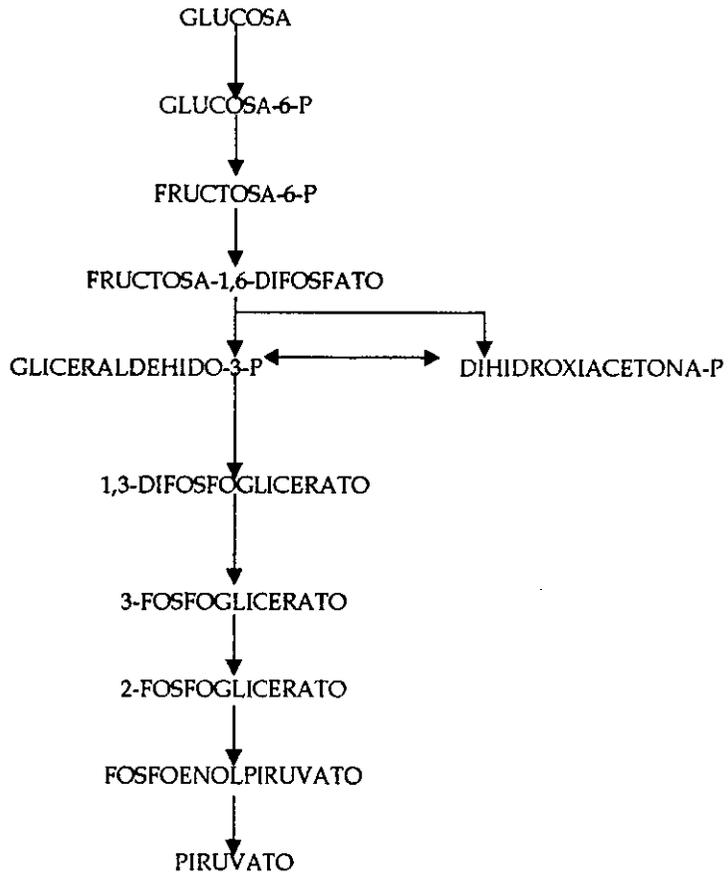


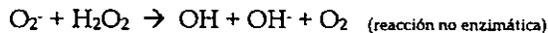
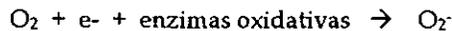
FIG. 1.1 Diagrama de la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP). Se han omitido los nombres de las enzimas que participan en cada reacción para mayor claridad. Esta vía tiene un costo energético de 2 ATP's, mientras que su ganancia es de 4 ATP's. (Tomado de Moat, 1985)

Algunas bacterias lácticas son capaces de producir diacetilo, el cual presenta un efecto inhibitorio a altas concentraciones, sobre bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, siendo las últimas las más afectadas. Su modo de acción no es muy claro, pero diversos estudios realizados por Varimō y Landesborough (1979) proponen que el diacetilo puede desactivar a las enzimas alcohol deshidrogenasa y a la adenilato ciclasa de levaduras, mediante la modificación de sitios catalíticos.

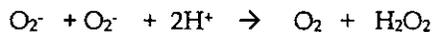
### 1.2.2 Crecimiento en presencia de oxígeno.

Los microorganismos que metabolizan glucosa u otros azúcares por vías fermentativas normalmente no utilizan el oxígeno molecular como aceptor final de electrones y no generan ATP por la vía de la fosforilación oxidativa. Estos microorganismos son metabólicamente anaerobios. En cambio a los microorganismos que requieren oxígeno para crecer se le denominan aeróbicos. Existe un tercer grupo de microorganismos que pueden tolerar un hábitat con bajas concentraciones de oxígeno, a estos se les denomina microaerofilicos (Volk y Wheeler, 1980).

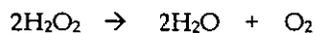
En presencia de oxígeno molecular se generan compuestos tóxicos como los superóxidos por la acción de enzimas oxidativas y la autooxidación de flavonas, quinonas, etc.



Muchos organismos aerobios y facultativos están protegidos de la acción tóxica de los superóxidos por la presencia de la enzima superoxido dismutasa (SOD):



El peróxido de hidrógeno es transformado en agua y oxígeno por la enzima catalasa:



Para su crecimiento, las bacterias lácticas requieren de azúcares como lactosa y glucosa además de aminoácidos, vitaminas, y otros factores de crecimiento. La leche es el medio

típico y satisfactorio para su desarrollo. Además de ella, existen otros alimentos que son medios excelentes para el desarrollo de estos microorganismos, tal es el caso de las masas de cereales, los vegetales y las carnes. (Shirai y col., 1996)

Además de que su rápido crecimiento permite que sean en poco tiempo la población dominante, las bacterias lácticas tienen propiedades antagonistas que les permiten competir exitosamente contra otros microorganismos. Las investigaciones al respecto, muestran que los agentes inhibitorios producidos por ellas son de tres tipos:

*Los metabolitos de oxígeno como el peróxido de hidrógeno*, que al reaccionar con el ion superóxido liberan radicales hidroxilo capaces de oxidar los lípidos de la membrana celular, y alterar también el material genético (Block, 1991).

*los productos provenientes del catabolismo celular, particularmente el ácido láctico*, que se caracteriza por ser un ácido débil, lipofílico. Esta propiedad le permite atravesar rápidamente la membrana celular microbiana, hasta llegar a un equilibrio entre su interior y el exterior, disipando el potencial de membrana y el gradiente de pH (Gould, 1991).

*los péptidos de bajo peso molecular como las bacteriocinas* (Dellaglio, 1994) de las cuales se habla con mayor detalle en la siguiente sección.

En resumen, se puede caracterizar a las bacterias lácticas como Gram positivas, no esporuladas, fermentadoras de carbohidratos, productoras de ácido láctico, ácido tolerantes, anaerobias o microaerofílicas, catalasa negativas, no móviles y no reductoras de nitratos (Shirai y col., 1996).

## GENERALIDADES DE LAS BACTERIOCINAS

### 2.1 DEFINICIÓN.

La definición del término bacteriocina ha cambiado gradualmente desde que la primera bacteriocina fue descubierta por Gratia en 1925. Esta bacteriocina, producida por una cepa de *E. coli*, era efectiva contra otras cepas de la misma especie. En esa ocasión fue llamada principio V; y en 1946 Gratia y Fredericq cambiaron este término por el de colicina. El nombre de bacteriocina fue usado por primera vez por Jacob y col. en 1953. Debido a que las colicinas eran el prototipo de bacteriocinas más ampliamente estudiadas en ese joven campo, éstas sirvieron como molde para definir a las bacteriocinas de otros géneros y especies de bacterias, sobre todo de bacterias Gram positivas.

Como resultado del auge en el estudio de este tipo de bacteriocinas de bacterias gram positivas, el grupo de Tagg (1976) propuso una nomenclatura para definir a las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas, siguiendo seis criterios basados en las características de bacteriocinas de bacterias Gram negativas (colicinas):

*Las bacteriocinas deben ser proteínas.* Si la actividad de la bacteriocina es inhibida por una o más proteasas, entonces es prueba suficiente de que el inhibidor microbiano es de naturaleza proteica.

- *El modo de acción es bactericida no bacteriostático.*
- *Las bacteriocinas tienen sitios específicos de unión.* Se sugiere que la bacteriocina se une a receptores específicos de la membrana citoplasmática de la célula sensible.
- *Tanto los genes que codifican para su biosíntesis como los genes de inmunidad de la célula productora están asociados a plásmidos.* Esto significa que hay genes que codifican específicamente para cada proteína antimicrobiana.
- *Las bacteriocinas son activas contra bacterias muy relacionadas taxonómicamente.*
- *Las bacteriocinas son producidas por biosíntesis letal.*

Fue hasta 1982 cuando Konisky concluyó que solo dos de los seis criterios eran verdaderos e indispensables para la definición de las bacteriocinas de bacterias Gram

positivas, estos son: su naturaleza proteica y su auto-inmunidad, este término se define como la nula actividad contra las células que las producen (Hoover, 1993).

Los cuatro criterios restantes pueden ser rebatidos por diversas investigaciones realizadas, que encontraron que:

- El modo de acción de las bacteriocinas puede ser bactericida o bacteriostático.
- Las bacteriocinas de bacterias Gram positivas no tienen sitios específicos de unión ya que su modo de acción es por su adsorción en la membrana citoplasmática de la célula sensible; la formación de poros o canales en la misma provoca la pérdida de moléculas tales como  $K^+$ , ATP, con lo cual se disipa la fuerza protón motriz. Este agotamiento de las reservas energéticas de la bacteria, conduce a una disminución en la síntesis de macromoléculas tales como ADN, ARN y proteínas, llevando finalmente a la muerte celular.

La localización del gene no es un criterio útil para la clasificación, puesto que no solo puede estar en un plásmido, sino también en un cromosoma.

La producción de la bacteriocina no es por síntesis letal, ya que las células productoras tienen un mecanismo de inmunidad.

## 2.2 NOMENCLATURA.

La nomenclatura de las bacteriocinas es muy sencilla. El sufijo "cina" se utiliza para denotar la actividad bacteriocinogénica. El sufijo se une a el nombre de la especie productora.

Tabla IV. Ejemplos de nombres de bacteriocinas que siguen la nomenclatura del sufijo "cinas". (Tomado de Hoover, 1993)

BACTERIOCINA	ESPECIE PRODUCTORA
colicina	<i>Escherichia coli</i>
monocina	<i>Listeria monocytogenes</i>
lactococcina	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
subtilina	<i>Bacillus subtilis</i>
estafilocina	<i>Staphylococcus aureus</i>

Aunque no en todos los casos se sigue esta nomenclatura, por ejemplo se les denomina nisina, lactacina y Pep5 a diversas bacteriocinas producidas por ciertas cepas de *Lactococcus lactis*

### 2.3 CLASIFICACIÓN.

En 1993 Klaenhammer propuso clasificar a las bacteriocinas en cuatro grupos:

• **GRUPO I. LANTIBIÓTICOS.** Grupo integrado por pequeños péptidos que contienen dehidroaminoácidos y tioéter aminoácidos (lantionina y metil-lantionina). Dependiendo de la estructura de sus anillos se subdividen en:

TIPO A. Moléculas anfipáticas, en forma de rosca ( 2.1 a 3.5 KDa). Contiene de 2 a 7 cargas positivas.

TIPO B. moléculas globulares (al rededor de 2 KDa). Tiene carga negativa o neutra.

• **GRUPO II. PÉPTIDOS PEQUEÑOS.** (< 10 kDa). Relativamente termoestables, no contienen lantionina. Subdivididos en :

Clase II-a. Péptidos activos contra *Listeria* con la secuencia consenso N-terminal Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys

Clase II-b. Los que necesitan dos péptidos para formar complejos de poración.

Clase II-c. Péptidos con grupos tiol (-SH) activos que requieren cisteína reducida para activarse.

• **GRUPO III. PROTEÍNAS GRANDES.** (>30 kDa) Termosensibles, incluye enzimas extracelulares bacteriolíticas.

• **GRUPO IV. BACTERIOCINAS COMPLEJAS.** Son proteínas que incluyen carbohidratos o lípidos en su estructura.

### 2.4 NATURALEZA GENERAL DE LAS BACTERIOCINAS.

Un antibiótico puede ser considerado como cualquier molécula química producida por un microorganismo que es dañina para el crecimiento de otro microorganismo. Sin embargo, en términos prácticos los antibióticos se definen como metabolitos secundarios de ciertos microorganismos, que inhiben el crecimiento de

otros microorganismos cuando se encuentran en pequeñas concentraciones, por tanto, se excluye de éste grupo a los productos del metabolismo primario, tal como son las sales de amonio, los ácidos orgánicos, el peróxido de hidrógeno, etc. los cuales también pueden provocar inhibición en el crecimiento de ciertos microorganismos.

En la práctica, no se considera a las bacteriocinas como antibióticos, pues como ya fue mencionado, estos son usados para inhibir o tratar alguna enfermedad infecciosa, por lo que está prohibido su uso en alimentos ya que esto produciría inmunidad a los microorganismos patógenos. En cambio, las bacteriocinas de bacterias lácticas usadas en alimentos no inhiben o tratan la progresión clínica de una enfermedad infecciosa, sino más bien conservan las características fisicoquímicas y sensoriales del producto en el que se empleen (Hoover y Steenson, 1993).

## 2.5 NATURALEZA PROTEÍCA.

Por definición, todas las bacteriocinas tienen un componente proteico o peptídico esencial para su función bactericida. Existen también algunas bacteriocinas que contienen varias proteínas en su estructura o que incluso estas proteínas están unidas a alguna otra macromolécula, ya sean carbohidratos o lípidos, como en el caso de las bacteriocinas de la clase IV.

### 2.5.1 Síntesis.

A diferencia de la mayoría de los antibióticos peptídicos, que son secuencialmente sintetizados en una serie de reacciones donde participan complejos enzimáticos, las bacteriocinas son sintetizadas por los ribosomas, durante la fase exponencial de crecimiento de la célula productora, como péptidos precursores (prepéptidos).

Estos prepéptidos son cortados secuencialmente de un péptido líder para formar la molécula biológicamente activa. En algunos casos (v.gr. lantibióticos) existen modificaciones postraduccionales en la molécula precursora antes del rompimiento de todo el componente líder.

### 2.5.2 Composición.

Las bacteriocinas presentan en su estructura conglomerados de aminoácidos cargados positivamente. Los residuos de aminoácidos tienen funciones específicas dentro de la proteína, tal es el caso de la lantionina y la  $\beta$ -metil-lantionina que confieren una mayor estabilidad en la conformación de la bacteriocina; otros, como la didehidroalanina, didehidrobutirina y las cistina (Cys-Cys) proveen a la molécula de grupos reactivos que incrementan su actividad biológica.

### 2.5.3 Estructura tridimensional.

Las bacteriocinas que contienen lantibióticos en su estructura presentan conformaciones bastante similares. Son péptidos helicoidales anfifílicos con mayor flexibilidad en soluciones acuosas que en soluciones lipofílicas (Jack y col., 1995).

## 2.6 MÉTODOS GENERALES PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LAS BACTERIOCINAS.

Las bacterias lácticas pueden competir con diversos grupos de microorganismos por la adquisición de los nutrientes y por la supervivencia en condiciones ambientales específicas (tales como la atmósfera gaseosa microaerofílica y pH ácido) además producen diversos metabolitos, incluyendo las bacteriocinas, capaces de inhibir el crecimiento de estos otros grupos. Por tanto resulta difícil determinar si la actividad inhibitoria se debe o no a la presencia de bacteriocinas.

Así, cuando se estudian bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, como en este caso, se debe tener cuidado con los demás productos metabólicos de éstas bacterias, tales como ácidos orgánicos y peróxido de hidrógeno.

La inhibición por ácidos orgánicos es debida al bajo pH y a las formas no disociadas de estos ácidos las cuales pueden penetrar fácilmente a la célula bacteriana causando la muerte.

La producción de peróxido de hidrógeno es muy común en bacterias lácticas, sobre todo en el género *Lactobacillus*. Para prevenir la formación de este metabolito es

necesario crecer las células productoras en ambientes anaerobios o agregar a los medios de cultivo enzimas tales como peroxidasa y catalasa.

La mayoría de los métodos empleados se basan en la observación de halos de inhibición en placas de agar que han sido previamente sembradas con una cepa indicadora y a las cuales se les ha adicionado la bacteriocina en orificios hechos sobre el agar. Esta zona de inhibición es el resultado de la difusión de la proteína a través del agar, lográndose así la inhibición en el crecimiento de las células sensibles. Se debe mencionar que la detección de actividad en medios sólidos es comúnmente utilizada, debido a su relativa facilidad, bajo costo y sobre todo por que da una idea muy cercana del potencial inhibitorio de la proteína (Hoover, 1993).

Es importante no solo detectar la actividad de la bacteriocina sino también poder cuantificarla. Para ello se ha recurrido al uso de unidades arbitrarias por mililitro (UA/ml) definidas como el recíproco de la máxima dilución en la cual se observa actividad inhibitoria. Para entender el concepto es necesario hablar del método de dilución crítica el cual se basa en la preparación de diluciones secuenciales de la muestra que contenga a la bacteriocina, las cuales se probarán en el medio sólido donde se quiere observar la actividad. La dilución más alta donde sea posible observar el halo de inhibición será la que se usará para el cálculo de las UA/ml.

## 2.7 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.

Como ya fue mencionado, la forma más sencilla de visualizar la actividad inhibitoria de cualquier compuesto producido por algún microorganismo es a través de pruebas en placas de agar, donde se puede observar rápidamente la influencia que ejerce este agente en el crecimiento de un microorganismo sensible a él.

Sin embargo, es preferible monitorear la actividad inhibitoria en medio líquido que en los medios sólidos, ya que es posible seguir la evolución del cultivo microbiano de la cepa sensible tratada con la bacteriocina., midiendo su D.O. a 600 nm de crecimiento (Hoover, 1993).

La optimización de las condiciones de producción de bacteriocina es un punto clave si el objetivo primordial es seguir un esquema de purificación, ya sea parcial o total, debido a que este paso nos brinda la oportunidad de obtener grandes cantidades de bacteriocina cruda haciendo más sencillos los subsecuentes pasos de purificación ya que durante ellos generalmente ocurren pérdidas notables en el rendimiento.

Muchos de los estudios realizados con los compuestos inhibitorios producidos por bacterias lácticas han usado medios similares a los productos con los que están asociadas las cepas, el ejemplo más claro es la leche. Debido a la variabilidad en la capacidad de algunas cepas lácticas de aprovechar este producto, muchas de estas cepas no crecen bien en medios basados solo en la composición de la leche. Una opción para estos casos es el uso de medios de cultivo comerciales que han probado ser los óptimos para el crecimiento de las células y la producción de la bacteriocina.

Muchos de los estudios basados en la optimización de la producción de las bacteriocinas de bacterias lácticas han utilizado medios comerciales (incluyendo algunas modificaciones de los mismos) para proveer al microorganismos de nutrientes indispensables para su crecimiento (Shirai y col., 1996).

Las cepas de *Lactococcus lactis*, cepas usadas en este proyecto, crecen en los diferentes medios comercialmente disponibles, tales como medio Elliker, CGB, MRS.

Los estudios enfocados en la obtención de nuevos medios de cultivo para el crecimiento de bacterias lácticas, han descubierto que muchas vitaminas del complejo B y algunos aminoácidos purinas y pirimidinas son necesarios para su crecimiento.

La producción de la bacteriocina también se ve afectada por las condiciones de crecimiento como es el caso de el pH, la temperatura y la atmósfera gaseosa que se emplee. (Bhunja, 1991)

## MODO DE ACCIÓN.

### 2.8.1 Espectro antimicrobiano.

Las bacteriocinas de bajo peso molecular producidas por bacterias lácticas, han demostrado tener actividad antibacteriana sobre otras bacterias Gram positivas. Por

ejemplo, el lantibiótico nisina es efectivo contra muchas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Clostridium*, y *Mycobacterium*, siendo su nivel de sensibilidad variable en cada caso.

Similarmente, algunas bacteriocinas que no contienen lantibióticos en su estructura, como la pediocina AcH, tienen un espectro antimicrobiano extenso, mientras que otras, como lactococcina A tiene un espectro muy estrecho.

### 2.8.2 Modo de acción primario.

A pesar del gran uso que se ha hecho de la nisina como bioconservador, hasta hace poco se logró conocer el mecanismo por el cual es capaz de inhibir el crecimiento de células bacterianas sensibles. Inicialmente se creía que la nisina actuaba como un surfactante, debido a su naturaleza catiónica y a que cuando se trataban células sensibles a ella, causaba rupturas en el material que absorbe luz UV (proteínas, DNA).

También se creía que la nisina actuaba como un inhibidor de biosíntesis de la membrana celular, sin embargo, debido a la utilización de grandes cantidades de bacteriocina para realizar estos experimentos se dudó que estos resultados se definieran como un modo de acción primario.

Se ha demostrado que el modo de acción de las bacteriocinas, tales como nisina y Pep5 es dependiente de la concentración, y que también se puede ver afectado por las condiciones fisiológicas, tales como la fuerza iónica, temperatura, y pH, así como la fase de crecimiento en la que se encuentran las células sensibles. Además, ambos lantibióticos inhiben la formación de DNA, RNA, proteínas y polisacáridos, por lo que se llegaba a la conclusión de que las células sensibles no tenían suficiente energía para llevar a cabo los procesos biosintéticos y que su membrana citoplasmática, transductora de energía, era el blanco bioquímico primario.

Lo anterior se comprobó cuando se realizaron experimentos donde se crecía *Staphylococcus simulans*, *B. subtilis* y *Micrococcus luteus* en presencia de precursores marcados radiactivamente. Las células eran capaces de importar y acumular los aminoácidos marcados pero no los podían incorporar en las proteínas intracelulares. El

tratamiento de estas células con nisina o algún otro antibiótico resultaba en la expulsión de los compuestos marcados radiactivamente. Algo similar sucedía cuando se trabajaba con  $Rb^+$ , un análogo de  $K^+$ , lo que indicaba que los mecanismos de transducción de energía habían sido afectados. Posteriormente se descubrió que cuando se trataban las células con Pep5, el ATP (del que ninguna forma conocida de transporte existe) podía ser detectado extracelularmente, por lo que se podía especular que el antibiótico formaba poros en la membrana citoplasmática bacteriana.

La medición de ATP que se registraba, era menor cuando se trabajaba con células no energizadas, que cuando se trabajaba con células energizadas con glucosa, esto indicaba que el estado de energización de la membrana era una determinante importante en la acción del antibiótico. La comprobación de la acción desenergizadora de la membrana por los antibióticos se ha dado por la medición directa del potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ) de las células tratadas.

El grado de energización de la membrana, previo a la acción del antibiótico parece ser crítico, indicando que se requiere de un potencial de membrana mínimo para la formación de poros.

En 1991 Sahl propuso un nuevo modelo que describía como ocurría la formación de poros en la membrana de las células sensibles que habían sido tratadas con antibióticos del grupo A. En una primera etapa, los péptidos deben ser fijados sobre la membrana, esta unión probablemente induce un cambio de conformación, estabilizando la estructura anfifílica completa, necesaria para la formación de poros. La fijación de los péptidos en la membrana aumenta la probabilidad de que estos formen oligómeros en la superficie membranal.

Además encontró que la energización de la membrana induce a los oligómeros a un estado de conductancia, probablemente haciéndolo adoptar una orientación transmembranal en la que la cola hidrófoba del agregado está expuesta al exterior, mientras que la cola hidrofílica constituye el lumen o cara interna del poro.

Este modelo toma en cuenta la flexibilidad y la naturaleza anfifílica de los péptidos en solución y considera que los poros representan los estados de

conductividad formados por un agregado de varios péptidos, la formación de oligómeros con un número variable de moléculas es posible. En consecuencia, según demostró Benz y col., (1991) se ha encontrado que existen poros en diferentes estados en la misma membrana y así se explican las diferencias en los niveles de conductancia.

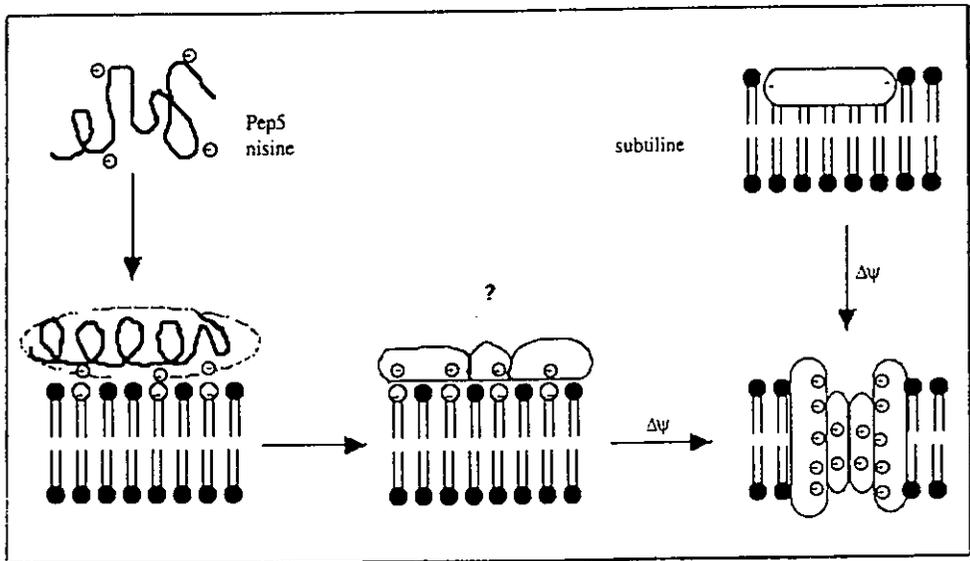


Fig. 2.1 Modelo de formación de poros en la membrana sensible debida a la acción de lantibióticos (nisina, Pep 5, etc.) Los péptidos son más sensibles en solución acuosa y adoptan una conformación anfifílica al entrar en contacto con la membrana, esta interacción se da a través de fuerzas iónicas. En cambio, la subilina ( bacteriocina producida por un bacilo Gram negativo) se inserta en la parte hidrófoba de la membrana. (Sahl, 1991).

Por otra parte es importante considerar que *in vivo* los péptidos pueden interactuar con los componentes de la membrana, estas interacciones pueden provocar una influencia considerable en la cinética de formación de poros, sobre su estabilidad, su tiempo de vida y quizá explique las diferencias en la estabilidad de especies bacterianas que son observadas con los diferentes lantibióticos.

Con respecto a el modo de acción de las bacteriocinas que no contienen lantionina, no existe tanta información, por ejemplo: 1) no se conoce la razón por la que, si dos cepas sensibles son tratadas con bacteriocina, una sufre lisis posterior al tratamiento, mientras que la otra no. 2) se desconoce el mecanismo por el cual la bacteriocina atraviesa la pared celular para entrar en contacto con la membrana citoplasmática. 3) existe evidencia de que las bacteriocinas que no contienen lantionina se adsorben en la mayoría de las células Gram positivas, incluyendo células sensibles, productoras, a lo cual no se ha logrado dar explicación.

En general, las bacteriocinas que no contienen lantionina parecen ejercer su modo de acción desestabilizando la membrana citoplasmática de las células sensibles, sin embargo, el mecanismo que siguen parece diferir de el usado por los lantibióticos. Por ejemplo, el tratamiento de células con bajas concentraciones de pediocina PA-1 o AcH y lactacina incrementa la permeabilidad de la membrana citoplasmática, observándose un flujo de afuera hacia adentro de pequeñas moléculas y un flujo en sentido contrario de material que absorbe en UV (aminoácidos, K<sup>+</sup>, o-nitrofenol). Sin embargo, estas bacteriocinas parecen actuar en las células sensibles sin importar su grado de energetización previa, lo que sugiere que la pérdida de permeabilidad de la membrana ocurre de manera dependiente a su voltaje.

### 2.8.3 Modo de acción secundario

Adicionalmente a la capacidad de formar poros en la membrana, la nisina y Pep5 inducen autólisis en *Staphylococcus simulans*, debido a su naturaleza fuertemente catiónica. Incluso los péptidos sintéticos, tal como polinisina, se pueden unir a los ácidos teicoico, lipoteicoico y teicuronico de la pared celular de esta bacteria, liberando y activando enzimas autolíticas que están normalmente unidas a estos sustratos. Debido a que la actividad autocatalítica depende del grado de cationicidad de los péptidos que interactúan con la célula, parece que las enzimas liberadas siguen un proceso tipo intercambio iónico.

La despolarización de la membrana con protonóforos es insuficiente para causar lisis y

tampoco *prepara* a la autólisis cuando es tratada con péptidos catiónicos, mientras que las células pre-energetizadas, en las cuales la formación de poros y la despolarización es acelerada, muestra lisis celular mucho mayor. Adicionalmente, como los poros formados en la membrana no son suficientemente grandes para permitir el paso de moléculas de peso molecular alto, existe una presión osmótica ejercida por el agua sobre los poros. El incremento en esta presión osmótica traerá como consecuencia lisis celular. En conjunto, los tres procesos no pueden ser reparados por mecanismos celulares.

En lo que respecta a las bacteriocinas que no contienen lantionina, las investigaciones varían notablemente en la observación de la lisis celular de cepas sensibles. Algunos reportan que si existe lisis celular, por ejemplo Pucci y col. (1988) quienes encontraron que al tratar cepas de *Listeria monocytogenes* con pediocina PA-1 la densidad óptica disminuía. Por otra parte, Bhunia y col. (1991) observaron que al trabajar con células sensibles de *Lactobacillus plantarum* NCDO 955, a las que se les adicionó pediocina AcH, dejaban de crecer, es decir no había aumento en la densidad óptica (D.O.) a 600 nm, pero tampoco un decremento, lo que indicaba que no existía lisis celular (Jack, 1995).

## 2.9 APLICACIONES DE LAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS LÁCTICAS.

### 2.9.1 Nisina.

#### *Propiedades.*

La nisina es un polipéptido antimicrobiano de aproximadamente 3500 daltons producido por algunas cepas de *Lactococcus lactis subsp. lactis*. De todas las bacteriocinas es la que ha demostrado la mayor aplicación comercial, siendo utilizada por primera vez como conservador en 1951. La nisina ha ganado aceptación mundial, incluso en E.U. donde recibió la aprobación de FDA (Food and Drug Administration) para su uso en queso procesado desde 1988. En México también está aprobado su uso, como se menciona en el capítulo 1 (Hoover, 1992).

La nisina se encuentra naturalmente en la leche, por lo que ha sido consumida por los

humanos desde hace cientos de años sin haberse reportado problemas toxicológicos. Se encuentra generalmente en forma de dímeros. Siendo muy común que las bacteriocinas de bacterias lácticas formen agregados. Contiene L-aminoácidos y S-aminoácidos, lantionina y  $\beta$ -metil-lantionina.

#### *Usos.*

La nisina se utiliza como conservador en bebidas y alimentos ácidos, donde los microorganismos sensibles a esta bacteriocina necesitan ser controlados. También es muy efectiva en quesos.

Para productos lácteos, la nisina es usada como un polvo mezclado con leche descremada deshidratada. En muchos de los países poco industrializados, donde la conservación a través del uso de la refrigeración es muy limitado, la nisina se agrega a la leche para aumentar su vida de anaquel y su seguridad higiénica. El uso de la nisina con tratamientos térmicos reducidos hace que la leche en polvo sea un alimento disponible en países donde el agua es insegura y las fuentes son escasas.

En el este de Europa la nisina se adiciona a los vegetales enlatados como una forma adicional de prevenir el crecimiento de las células de *Clostridium botulinum*.

#### 2.9.2 Otras aplicaciones de las bacteriocinas.

Además de su uso en alimentos, las bacteriocinas pueden ser empleadas en pastas de dientes y enjuagues bucales, donde han demostrado tener un amplio espectro de actividad contra las bacterias que causan la placa dental, así como su uso en jabones y otros productos para el cuidado de la piel.

También pueden ser usadas para el tratamiento de la mastitis bovina, enfermedad de las ubres de las vacas que anualmente causa pérdidas millonarias en la industria de los productos lácteos.

Recientemente se ha encontrado su aplicación en el área biotecnológica, como marcadores genéticos, donde los genes que codifican para la síntesis e inmunidad de la bacteriocina pueden servir para identificar otros genes asociados a plásmidos en los estudios de transferencia de genes (Hoover, 1993).

### 3. METODOS DE PURIFICACIÓN

#### 3.1 Una visión general.

Existen diversas técnicas de purificación de bacteriocinas de bacterias lácticas. El método que se elija dependerá, en gran medida, de la aplicación que se desee para la bacteriocina estudiada. Un factor de vital importancia durante cualquier esquema de purificación es el poder medir la actividad de la proteína en cada paso del proceso.

Debido a que las bacteriocinas son secretadas al medio de cultivo, la mayoría de los métodos inician con un paso de concentración de la bacteriocina presente en el sobrenadante (v.gr. reduciendo el volumen de medio de cultivo).

La precipitación puede simultáneamente concentrar las bacteriocinas y eliminar proteínas contaminantes.

Otros métodos han sido probados para el caso de concentrar y purificar la proteína, tal es el caso de la diálisis y la ultrafiltración. Durante la diálisis hay un equilibrio molecular que causa el intercambio de moléculas difusibles, mientras que la ultrafiltración utiliza la presión positiva para forzar el equilibrio en favor del filtrado.

Los métodos anteriores juegan un importante papel en la purificación de la proteína, pero si se requiere de un alto grado de pureza no son suficientes, por lo cual es necesario emplear otros métodos, tal es el caso de los diversos tipos de cromatografía, que incluyen: exclusión por tamaño (filtración en gel), adsorción (intercambio iónico) y/o interacciones hidrofóbicas (fase reversa). La cromatografía líquida de alta presión (HPLC) también ha sido utilizada pues es un método muy eficiente. Como un paso final, la pureza de la bacteriocina debe ser confirmada; comúnmente se utilizan geles de electroforesis (SDS-PAGE) para este propósito.

Los diferentes pasos que se utilizaron para purificar a la proteína (bacteriocina L5) se estudian a continuación con más detalle.

#### 3.2 Centrifugación.

Esta técnica es importante para separar a las células y algunas impurezas grandes de el el sobrenadante que contiene a la bacteriocina.

La sedimentación por fuerzas centrífugas es la aplicación de la aceleración radial a partículas en suspensión por el movimiento rotacional. Las partículas más densas que su medio de suspensión se moverán rápidamente al perímetro de la centrífuga. Contrariamente, las partículas más ligeras se moverán rápidamente hacia el centro. La velocidad de sedimentación,  $V_g$ , de una partícula en un fluido menos denso bajo la influencia de la gravedad está dada por la ley de Stokes:

$$V_g = D^2 \frac{d_1 - d_2}{18 \mu} g$$

Donde:

$D$  = diámetro de partícula,

$d_1$  = densidad de partícula,

$d_2$  = densidad del líquido,

$\mu$  = viscosidad del fluido

$g$  = aceleración gravitacional.

En la centrifugación, el término  $g$  se sustituye por  $w^2R$ , donde  $R$  es la distancia de la partícula desde el centro de rotación y  $w$  es la velocidad angular de la centrífuga (radianes / s) =  $\pi n / 30$ , donde  $n$  es la velocidad rotacional del rotor en revoluciones por segundo.

De la ecuación anterior podemos ver que la velocidad de sedimentación de una partícula se puede incrementar si:

1. se incrementa el diámetro de partícula ( $D$ );
2. se incrementa la diferencia entre las densidades de la partícula y el líquido ( $d_1 - d_2$ )
3. se incrementa la velocidad de la centrífuga ( $w$ )
4. decese la viscosidad del líquido ( $\mu$ )
5. En adición, incrementado el tiempo de exposición de la partícula a la fuerza centrífuga, causará que la partícula se aleje más del centro de rotación (ELV Harris, 1994).

### 3.3 Precipitación por salado.

La precipitación por adición de sales neutras es probablemente el método más utilizado para fraccionar las proteínas, por tanto resulta adecuado para separar a la bacteriocina L5 (estudiada en este trabajo) del sobrenadante, si consideramos que las bacteriocinas de bacterias lácticas son polipéptidos hidrófobos. La proteína precipitada generalmente no es desnaturalizada y su actividad es recuperada cuando se redissuelve el pellet. Además, estas sales pueden estabilizar las proteínas contra la desnaturalización, proteólisis o contaminación bacteriana, por lo cual un paso de salado es ideal para mantener un extracto toda la noche, ya sea antes o después de centrifugar. La precipitación por salado depende de la naturaleza hidrofóbica de la superficie de la proteína. Los grupos hidrofóbicos predominan en el interior de la proteína, pero algunos se encuentran localizados en la superficie, generalmente en agregados. Cuando las proteínas están solubilizadas, el agua está en contacto con estos grupos (fig 3.1).

Cuando las sales son adicionadas al sistema, el agua solubiliza los iones de las sales y mientras incrementa la concentración de estas sales, el agua es removida del rededor de las proteínas, exponiéndose eventualmente los agregados hidrofóbicos, los cuales interactúan entre sí, dando como resultado la agregación de la proteína. Entonces, las proteínas con mayor número o tamaño de agregados hidrofóbicos, precipitarán antes que aquellas con menor número o tamaño de agregados hidrofóbicos, de ahí que la precipitación por salado sea un método que pueda separar las proteínas presentes en una mezcla.

El agregado que se forma es una mezcla de muchas proteínas, por lo que la naturaleza del extracto afectará la concentración de sal requerida para precipitar la proteína de interés. Se sabe además, que al incrementar la temperatura se incrementa la precipitación de las proteínas, a pesar de ellos, esta técnica se realiza a temperaturas de refrigeración (4 °C) con el fin de evitar el riesgo de inactivación causado, en muchos de los casos, por proteasas.

La eficiencia de las sales está determinada principalmente por la naturaleza del anión, los aniones de carga múltiple son los más efectivos; el orden de efectividad es: fosfato > sulfato > acetato > cloruro. A pesar que el fosfato funciona mejor que el sulfato, en la práctica las sales de fosfato en solución solo contienen los iones  $\text{HPO}_4^{2-}$  y  $\text{H}_2\text{PO}_4^+$  a pH neutro, mientras que el ion  $\text{PO}_4^{3-}$ , el cual tiene mayor efectividad, no se encuentra presente.

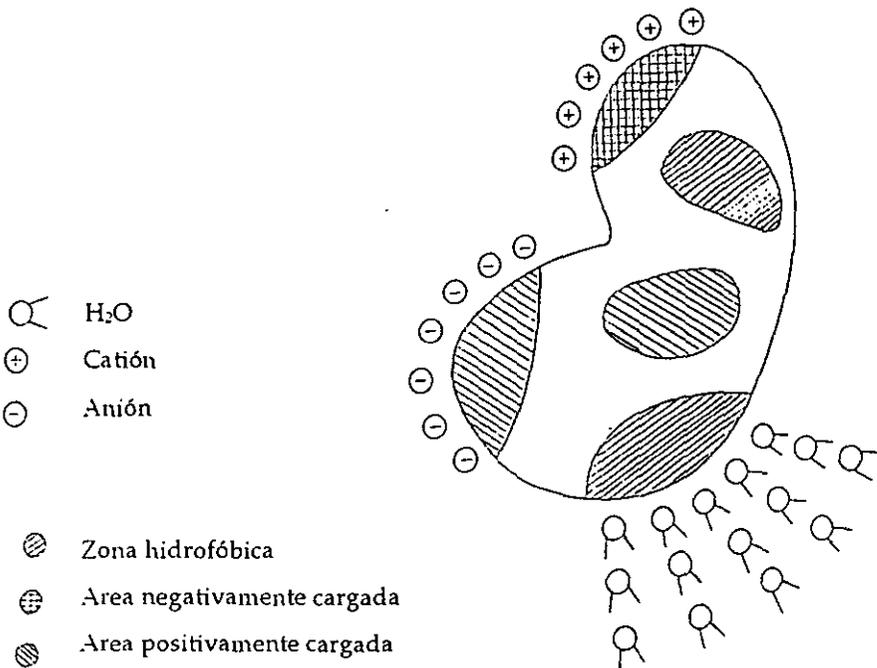


Fig. 3.1 Representación esquemática de una proteína que tiene zonas cargadas positiva y negativamente y que interactúa con iones en solución. Las zonas hidrofóbicas de la proteína interactúan con las moléculas de agua causando una matriz ordenada de moléculas de agua sobre esta zona. (Tomado de ELV Harris, 1994)

Por su parte, los cationes monovalentes son los más efectivos, siendo mejor  $\text{NH}_4^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+$ . Adicionalmente, la sal que se utilizará deberá ser barata y con relativamente pocas impurezas, para evitar que los pasos de purificación se incrementen.

La consideración final que debe hacerse es la densidad de la solución resultante, debido a que la diferencia entre las densidades del agregado proteico y de la solución determinarán la facilidad de separación por centrifugación.

En la práctica, el sulfato de amonio es la sal más comúnmente empleada, debido a su bajo costo y a su rápida solubilidad: una solución saturada en agua pura contiene aproximadamente 4 moles por litro. La densidad de esta solución saturada es de 1.235 g/ml (aunque en la práctica la densidad de la solución saturada es forzosamente mayor debido a los componentes del medio) en comparación con 1.29 g/ml de un agregado proteico en esta solución. La concentración de sulfato de amonio se maneja, por lo general, en porcentaje, para ellos se asume que la misma cantidad de sal que se disolverá en agua pura, lo hará en el sobrenadante. Existen, también, tablas con los valores de sulfato de amonio que se deben agregar para una saturación final deseada. (ver anexo III)

El sulfato de amonio acidificará el sobrenadante de manera mínima y gradual, por lo cual se debe prever el uso de un buffer si es que se desea mantener un pH definido.

Usualmente, para obtener un grado de purificación mayor, la precipitación por salado se fracciona, es decir, el sobrenadante es llevado hasta una concentración de sal donde la proteína de interés no precipite, y el precipitado es removido por centrifugación. Posteriormente, se agrega más sulfato de amonio, hasta una concentración donde la proteína de interés si precipite.

Dos puntos importantes en este método son la adición lenta de la sal y la agitación, debido a que una agitación muy vigorosa podría conducir a la desnaturalización de la proteína.

### 3.4 Diálisis.

El proceso de dializado remueve las sales de una solución, también se utiliza para hacer un cambio de buffer después de un paso de purificación, con el fin de evitar interferencias en los siguientes pasos.

El método consiste en poner la solución que contiene a la proteína, en membranas semi-permeables, y colocarlas en un buffer, las moléculas más pequeñas pasarán libremente a través de la membrana mientras que las moléculas más grandes serán retenidas. Las membranas de diálisis están generalmente hechas de acetato de celulosa, con poros de 1 a 20 nm de diámetro. El tamaño de estos poros determinará el peso molecular más pequeño que será retenido por la membrana. Para asegurar que el tamaño de poro de la membrana sea uniforme, éstas deben de seguir un tratamiento previo a su uso, lo que además asegurará la eliminación de metales pesados contaminantes, que suelen afectar adversamente la actividad de cualquier proteína.

Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana libremente hasta que la presión osmótica se iguala, por lo cual para completar la remoción de sales es necesario hacer varios cambios de buffer de diálisis.

Para conocer la concentración a la cual se llegará con un cambio de buffer se tiene la siguiente ecuación:

$$\frac{V_1}{V_1+V_2} \times C_1 = C_2$$

Donde:

$V_1$ = volumen de muestra (solución proteica)

$C_1$ = concentración inicial de la muestra

$V_2$ = volumen del buffer de diálisis

$C_2$ = concentración final de la muestra

La preparación de las membranas de dialisis utilizadas durante la purificación parcial de la bacteriocina L5 se describe en el Anexo II.

### 3.5 Cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

La cromatografía puede definirse como la técnica de separación de una mezcla de solutos, basándose esta separación en la diferente velocidad con que se mueve cada uno de los solutos a través de un medio poroso, arrastrados por un disolvente en movimiento.

La cromatografía líquida de alta presión (HPLC por sus siglas en inglés) es una técnica relativamente reciente. La respuesta de un sistema de este tipo es muy rápida, tanto que los picos se registran en el cromatograma casi al mismo tiempo que emergen los compuestos de la columna, lo que permite una vigilancia continua de la separación de los componentes de la muestra. El equipo de cromatografía líquida cuenta con un inyector, una columna, un horno, un termostato, un detector y un registrador.

Las gráficas obtenidas de los registradores son llamadas cromatogramas. Estos son registros de la concentración o del perfil de la masa de los compuestos de la muestra como una función del movimiento de fase móvil. La posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra. El área bajo el pico nos indica la cantidad de componente, de igual forma se puede saber la complejidad de la muestra al observar el número de picos (Abbot, 1983).

### 3.6 Cromatografía de filtración en gel.

En la cromatografía de filtración en gel, también llamada cromatografía de exclusión por tamaños o de tamiz molecular, las moléculas se separan de acuerdo con sus tamaños y sus pesos moleculares.

En esta técnica la fase estacionaria está constituida por gránulos de un material esponjoso hidratado, que contiene poros, que comprenden un intervalo de tamaños relativamente reducido de dimensiones moleculares. Se hace atravesar una dilución acuosa, que tenga moléculas de varios tamaños, por una columna que contenga estos tamices moleculares, las moléculas que sean demasiado grandes para atravesar los poros quedarán excluidas del volumen del disolvente contenido en el interior de los gránulos del gel. Estas moléculas más grandes, atravesarán, por tanto, la columna mas

rápidamente, es decir, en un volumen de eluyente menor que las moléculas que circulan a través de los poros.

La masa molecular de la partícula más pequeña que es incapaz de penetrar en los poros de un gel determinado se dice que es el límite de exclusión del gel (Voet, 1996).

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

Existen diversas formas de conservar un alimento, ya sea mediante la adición de conservadores o por el empleo de técnicas como deshidratación, refrigeración y congelación, calor e irradiaciones.

La presente investigación esta orientada al estudio de conservadores naturales (de origen bacteriano). Específicamente de las denominadas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, metabolitos de origen proteico, cuya actividad bactericida e inocuidad toxicológica les permite ser consideradas como conservadores en una gran variedad de alimentos.

En estudios previos se había observado que la cepa de *Lactococcus lactis* 5 producía un metabolito con propiedades antimicrobianas, quedando establecido que se trataba de una sustancia del tipo bacteriocina. Resultaba entonces interesante estudiarla, y caracterizarla debido a que esto nos permite conocer sus propiedades fisicoquímicas, así como el espectro de actividad que posee para que de esta manera se pueda elucidar el tipo de alimentos en los cuales su empleo es factible, tomando en cuenta el tipo de microorganismos sobre los cuales podría tener un efecto inhibitorio.

#### 5. OBJETIVOS

##### 5.1 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la bacteriocina producida por la cepa de *Lactococcus lactis* 5 clave BM-B-337, proveniente del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de acuerdo a su capacidad para inhibir el crecimiento de cepas taxonómicamente relacionadas.

##### 5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la actividad bactericida de la bacteriocina y establecer su espectro de actividad.
- Optimizar la producción de la bacteriocina secretada por la cepa de *Lactococcus lactis* 5.
- Purificar parcialmente la proteína (bacteriocina).
- Caracterizar la estabilidad de las bacteriocinas a factores como temperatura y pH

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 CONSERVACIÓN DE CEPAS. Las cepas utilizadas en este estudio y sus condiciones de crecimiento se enlistan en la tabla 1.

Tabla 6.1 Bacterias lácticas usadas en la presente investigación.

CEPA	CLAVE	No.*
<i>Lactococcus lactis</i>	NRRL-B-2356	1
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>	BM-B-147	2
<i>Lactococcus lactis</i>	NRRL-B-633	3
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>	BM-B-149	4
<i>Lactococcus lactis</i> 5	BM-B-337	5

Nota: todas las cepas crecen bajo las siguientes condiciones: medio Elliker, temp. 30 °C, atm. microaerofílica. Además, todas las cepas pertenecen a la colección de microorganismos del cepario del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. (\* el número dado a cada cepa sirve para identificarlas a lo largo de toda la investigación.)

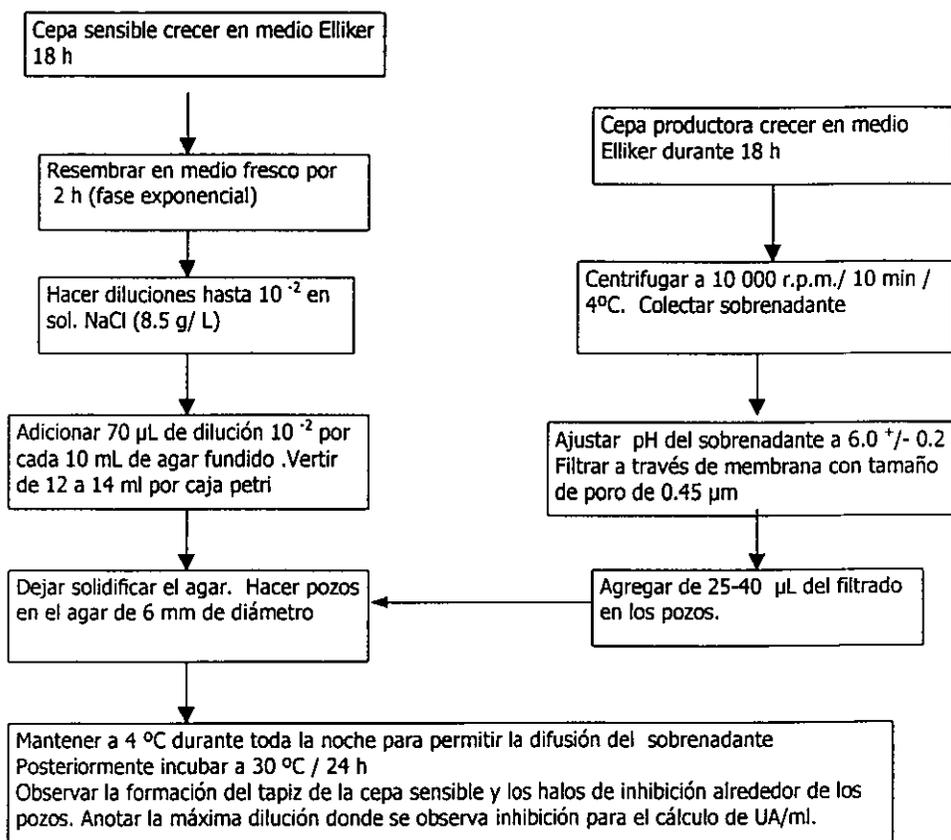
El stock fue conservado a -70 °C en glicerol al 20% y a - 20 °C en medio de leche descremada, del cual se tomaban 200 µL para repicar dos veces en medio Elliker antes de cada experimento.

### 6.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.

Las cinéticas de crecimiento y de producción de ácido, de las cinco cepas, se llevaron acabo en tubos de ensayo que contenían 9 ml de medio Elliker, bajo las siguientes condiciones: T= 30 °C; atmósfera: microaerofílica; sin agitación. Se midió la densidad óptica (D.O.) a 600 nm durante 24 h y la producción de ácido a través de la variación de pH en el tiempo, hasta la hora 24 (Cappuccino, J. 1990).

### 6.3 DETECCIÓN Y ENSAYO DE LA BACTERIOCINA.

Para medir la actividad de la bacteriocina se utilizó la técnica de Schillinger & Lucke de los pozos de agar (agar spot test, 1989).



#### 6.4 SELECCIÓN CRUZADA (SCREENING).

En estudios previos (Barrena, 1996) se seleccionaron cepas de bacterias lácticas que fueran capaces de inhibir el crecimiento de cepas taxonómicamente relacionadas, probablemente por la producción de bacteriocinas. En la tabla 6.2 se muestran las cepas utilizadas durante estos estudios.

Tabla 6.2 Lista de bacterias lácticas usadas en la selección primaria

BACTERIAS LACTICAS USADAS EN LA SELECCIÓN PRIMARIA.	
CEPAS	NÚMERO
<i>Lactococcus lactis</i> NRRL-B-2356	1
<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i> BM-B-147	2
<i>Lactococcus lactis</i> NRRL-B-633	3
<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> BM-B-149	4
<i>Lactococcus lactis</i> BM-B-337	5
<i>Lactobacillus plantarum</i>	6
<i>Lactobacillus plantarum B-39</i>	7
<i>Lactobacillus casei</i>	8
<i>Lactobacillus lechmani B-15</i>	9
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ARRLB 512	10
<i>Lactobacillus citroborum</i>	11

De esta selección primaria se eligieron las cinco primeras cepas, con las cuales se realizó una selección cruzada (screening secundario) con el fin de conocer cuales cepas eran sensibles a las bacteriocinas producidas por la cepa 2 (la cual es productora de nisina) y la cepa 5 (que en los estudios previos se había detectado que producía una bacteriocina que denominamos L5).

La selección cruzada fue monitoreada a través de las cinéticas de mortalidad de las cinco cepas, midiendo la densidad óptica (D.O.) a 600 nm Spectronic instruments 21D ya que resultaba más rápido cuantificar la actividad inhibitoria en medio líquido que en medio sólido. El blanco utilizado en todos los casos fue medio de cultivo Elliker estéril.

A sobrenadantes que contenían las bacteriocinas de las cepas 2 y 5 se les ajustó el pH a 6.0. Las cepas sensibles 1, 2, 3, 4 y 5 se crecieron en medio Elliker durante 24 h,

posteriormente fueron sembradas en medio fresco por 2 h (fase exponencial). Un mililitro de este medio se usó como inóculo para 9 ml del medio Elliker estéril, donde se llevaría a cabo la cinética. Se probaron diversas concentraciones de sobrenadante que contenía la bacteriocina y diferentes tiempos de adición teniéndose una mejor actividad inhibitoria con 400  $\mu$ L adicionadas a la 4<sup>a</sup> hora, es decir en la fase exponencial de crecimiento. Se contaba además, con un testigo el cual fue tratado en las mismas condiciones exceptuando el paso de la adición de la bacteriocina. Se midió la densidad óptica a 600 nm para observar el efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de las cepas sensibles. La bacteriocina (nisina) producida por la cepa 2 se utilizó como control positivo. Pero el interés se centró sobre la bacteriocina L5. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

## 6.5 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.

Se escaló la producción de la bacteriocina L5 en un fermentador New Brunswick Scientific de 4L (Croeger, 1989). El medio ideal para cepas del género *Lactococcus*, de acuerdo a lo reportado por Meghrouh y col. (1995), es el medio CGB (ver composición en el anexo I) por lo cual éste fue utilizado en todas las pruebas subsecuentes de fermentador. Las condiciones constantes de la fermentación fueron: temperatura 30 °C; agitación 200 r.p.m.; inóculo al 5% y tiempo de fermentación de 24 h. Las condiciones variables fueron: la atmósfera gaseosa (microaerofílica, atmósfera de nitrógeno y atmósfera de bióxido de carbono); el control de pH en 5.5, y por último la variación de uno de los componentes del medio de cultivo, el tween 80, de 01.% al 1.0%.

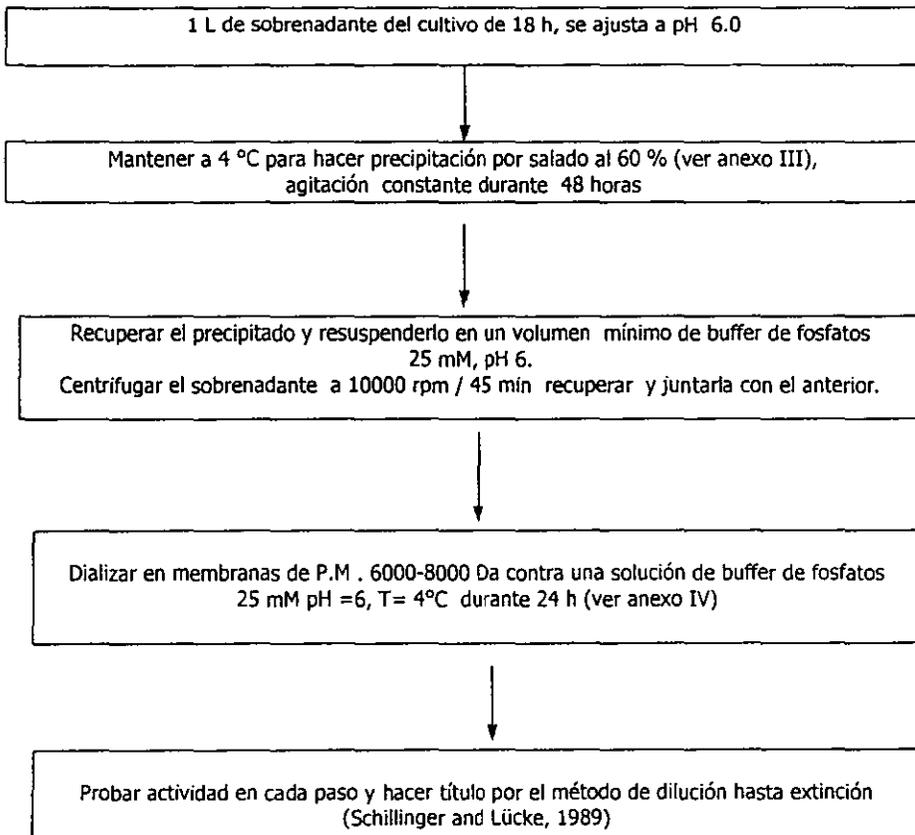
En cada caso se midió la D.O. del medio de cultivo de la misma forma como se había realizado previamente en la cinética de crecimiento, considerando que cuando los valores de D.O. eran mayores de 0.8 (valor límite de linealidad de la ley de Lambert-Beart) se hacían diluciones 1 a 10. También se midió la variación del pH, además se incluyó la prueba de detección de bacteriocina, con el fin de conocer en que etapa se iniciaba su producción. De esta manera se observarían las diferencias entre los distintos fermentadores y se definirían las condiciones óptimas de crecimiento de la

cepa 5 y la producción de la bacteriocina L5. Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

## 6.6 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA.

Se realizaron pruebas preliminares con protocolos de purificación de bacteriocinas de bacterias lácticas desarrolladas por diversos grupos de investigación y con base en los resultados obtenidos se diseñó un protocolo de purificación para la bacteriocina L5.

MÉTODO MODIFICADO POR E. GRAJALES y C. BARRENA (1998).



En cada caso se probó la actividad de la bacteriocina para definir en que paso se perdía la actividad y en cual aumentaba. La purificación parcial de la proteína se realizó por triplicado.

La actividad se midió por el método de dilución hasta extinción el cual consiste en hacer diluciones del sobrenadante y aplicarlo en los pozos hechos en el agar previamente sembrado con la cepa sensible.

Con este resultado se cuantificó la actividad de la bacteriocina mediante el parámetro de unidades arbitrarias por mililitro UA/ml (definidas en el capítulo 2) utilizando la siguiente fórmula:

$$UA / ml = 1 / MA \times 1 / DL \times FC$$

Donde:

MA =  $\mu$ L de muestra adicionada a los pozos de agar

DL = máxima dilución donde se observa halo de inhibición

FC = factor de conversión de  $\mu$ L a mL

El siguiente paso de purificación consistió en pasar la proteína tratada en el punto anterior, por una columna de filtración en gel de 60-300 Sephadex G-25 y analizarla por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Presión (HPLC). Las condiciones para este ensayo fueron las siguientes: se eluyó la muestra con buffer de fosfatos 25 mM pH=6, con una velocidad de flujo de 0.25 ml / min; un tiempo de corrida de 70 min y un volumen de inyección de 500  $\mu$ L. La longitud de onda a la cual se monitoreo la proteína fue de 280 nm.

Las fracciones fueron colectadas cada dos minutos y se probó su actividad por el método de los pozos de agar.

Cada ensayo se realizó por duplicado.

## **6.7 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA BACTERIOCINA L5 PARCIALMENTE PURIFICADA.**

Este punto era importante para conocer el grado de purificación de la bacteriocina y definir con un nivel de confianza mayor, la acción de la bacteriocina sobre la cepa sensible.

Las cepa sensible 1 se creció en medio Elliker durante 24 h, posteriormente fue sembradas en medio fresco por 2 h (fase exponencial). Un mililitro de este medio se usó como inóculo para 9 ml del medio Elliker estéril, donde se llevaría a cabo la cinética de mortalidad. En la cuarta hora de crecimiento se adicionó un mililitro de bacteriocina L5 parcialmente purificada. El testigo fue tratado en las mismas condiciones exceptuando el paso de la adición de la bacteriocina. Además se siguió nuevamente la cinética de mortalidad de la cepa 1 cuando se le adicionó el sobrenadante que contenía a la bacteriocina, con el fin de poder comparar los resultados. Se midió la densidad óptica a 600 nm para observar el efecto de la bacteriocina sobre el crecimiento de la cepa sensible.

Adicionalmente se realizaron conteos en placa para respaldar los resultados. Cada ensayo se llevó a cabo por duplicado.

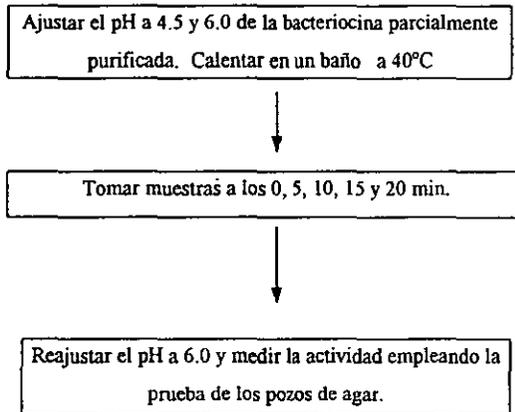
## **6.8 CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA PARCIALMENTE PURIFICADA A FACTORES FÍSICOQUÍMICOS COMO pH Y TEMPERATURA.**

La caracterización de la bacteriocina a factores como pH y temperatura resulta indispensable puesto que nos brinda los parámetros necesarios para conocer en que tipo de alimentos podría ésta ser empleada.

Por tanto, se fijaron dos valores de pH, 4.5 y 6, de acuerdo a lo que se conoce de las características de las bacteriocinas de bacterias lácticas y además se establecieron temperaturas menores de 70°C, ya que durante los protocolos de purificación se observó que esta temperatura era suficiente para inactivar la bacteriocina. Después la temperatura máxima fijada se disminuyó

pruebas preliminares se observó que 45 °C era la temperatura más alta donde la bacteriocina aun presentaba actividad.

La técnica consistió en :



Adicionalmente se hicieron pruebas de la estabilidad de la bacteriocina a temperaturas de refrigeración (4°C) y de congelación (-20°C). Estas pruebas consistieron en medir la actividad inhibitoria durante una semana para la temperatura de refrigeración y durante 2 meses en el caso de la temperatura de congelación. Cada ensayo se realizó por duplicado.

## 7. RESULTADOS

En estudios previos se realizó una selección primaria con 11 cepas de bacterias lácticas (enlistadas en la tabla 6.2) con el fin de conocer cuales de ellas eran probables productoras de bacteriocinas y cuales eran sensibles a éstas. De esta primera etapa se descartaron 6 cepas y se trabajó con las cinco restantes (numeradas 1 a 5).

Posteriormente se realizó una selección cruzada (screening) con el propósito de conocer cuales de las cepas de *Lactococcus lactis* (1 a 5), eran productoras de bacteriocinas y cuales eran sensibles a éstas. Entre esas cinco cepas contabamos con un control positivo, *Lactococcus lactis subsp. lactis* BM-B-147 (cepa 2) productora de nisina, la única bacteriocina aprobada para ser usada en alimentos (Hoover, D. 1992).

### 7.1 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.

Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las cinco cepas (cuyas características se enlistan en la tabla 6.1) con el fin de conocer su comportamiento en las distintas fases de desarrollo (fig. 7.1).

Las cinco cepas presentan una fase de adaptación (fase lag) de aproximadamente dos horas, la cepa 2 es la excepción, pues su fase lag es más corta. Posteriormente se observa un rápido incremento en el número de células, medido como densidad óptica (D.O.) a 600 nm. En esta fase, denominada fase logarítmica de crecimiento, se observa en general que la tendencia en la cinética de crecimiento es la misma, solo se observan algunas diferencias. La cepa 2 tiene un crecimiento muy acelerado y a la cuarta hora de iniciada la cinética se encuentra duplicado su crecimiento con respecto a las cepas 3, 4 y 5, mientras que la diferencia con la cepa 1 es de 3 veces más. Incluso, a partir de la 7ª hora ya ha alcanzado su fase estacionaria con una D.O. a 600 nm de 1.15 unidades.

Las cepas 3 y 4 presentan cinéticas de crecimiento muy similares, solamente se observa un ligero incremento (de 0.5 unidades) en la D.O. de la cepa 3, que incluso la hacen quedar por encima de la D.O. final de la cepa 2.

Por otra parte, tanto la cepa 1 como la 5 presentan un crecimiento muy lento, a pesar de que la cepa 5 inicia su fase log a la par de las cepas 2, 3 y 4, se hace evidente entre la 5ª y 6ª horas una desaceleración en la tasa de crecimiento, que trae como resultado que la cepa 5 tenga la D.O. final más baja de todas las cepas, incluso menor que la cepa 1, la cual tiene una D.O. final de 1.05 unidades.

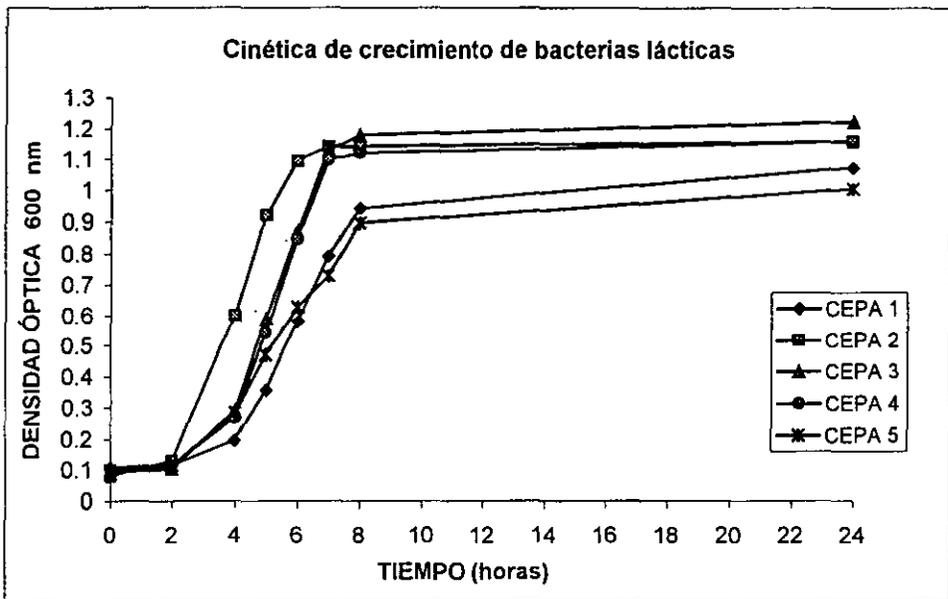


Figura 7.1 Cinética de crecimiento de bacterias lácticas en el transcurso de 24 h. Condiciones de incubación: en matraz de 125 ml, vol. de llenado 50 ml de medio Elliker líquido; temperatura 30 °C, atmósfera microaero fílica, sin agitación ni control de pH

## 7.2 EFECTO DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS PRODUCTORAS SOBRE LAS CEPAS SENSIBLES.

Como resultado de la selección cruzada se encontró que las bacteriocinas de las cepas 5 y 2 (productoras) inhibían el crecimiento de las cepas 1, 3 y 4 (sensibles). Estas

dos cepas no presentaban autoinhibición, sin embargo, la cepa cinco fue sensible a la bacteriocina de la cepa 2 (productora de nisina) y no en el caso contrario.

Se utilizó el sobrenadante de un cultivo de 18 horas ajustándolo a pH=6 con NaOH 0.1 N, con lo cual se neutralizaron los ácidos orgánicos que las cepas 2 y 5 produjeron durante su crecimiento, descartando así la posibilidad de que haya sido éste el factor de inhibición (Gould, 1991); así mismo, se creció a las cepas productoras en condiciones microaerofílicas con el fin de evitar la producción de peróxido de hidrógeno el cual es otro de los metabolitos principales que pudieran ser causantes de la muerte celular de la cepa sensible (Block, 1991).

En la gráfica 7.2 se muestra que tanto el sobrenadante de la cepa 2 como el de la cepa 5 inhiben el crecimiento de la cepa sensible 1 cuando se ponen en contacto con ella, es decir a la cuarta hora.

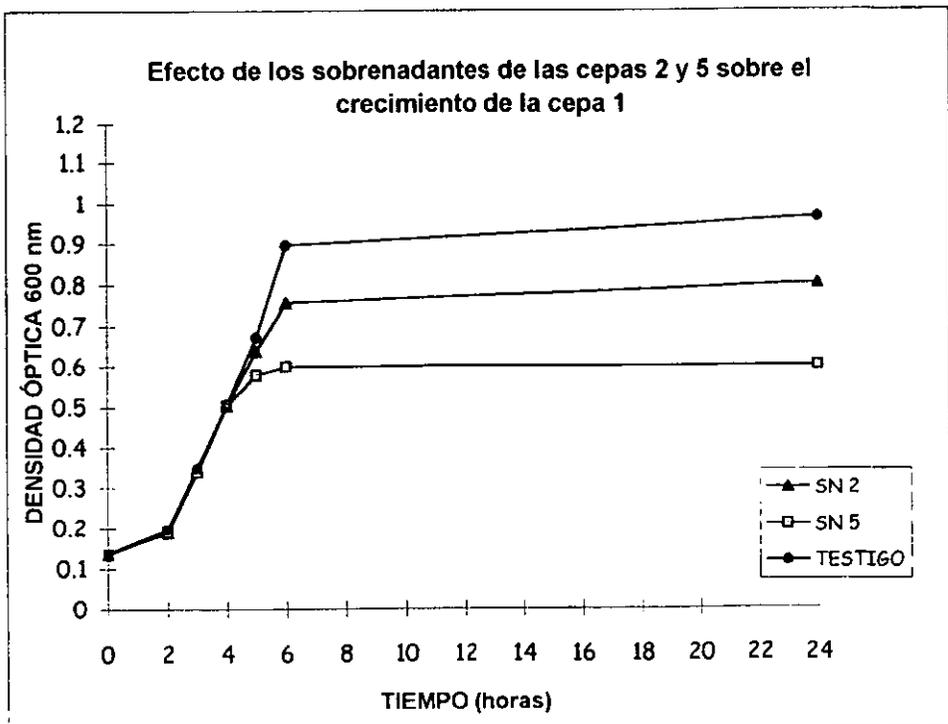


Fig. 7.2 Ensayo de mortalidad donde se muestra el efecto inhibitorio del sobrenadante de las cepas productoras bacteriocinas (130 UA / ml) en el crecimiento de la cepa sensible 1, adicionados a una D.O. de 0.5 unidades.

En las curvas de crecimiento la diferencia en la D.O. a 600 nm se hace más notoria a partir de la 5ª hora. Los cultivos a los cuales se les adicionaron 400 µl de sobrenadante con actividad de 130 UA/ml, sufren una disminución en el número de células presentes con respecto al cultivo testigo, el cual sigue su crecimiento normal y llega a un valor de absorbancia de 1 unidad, mientras que el cultivo al que se le adicionó el sobrenadante de la cepa 2 presenta una D.O. de 0.8 unidades. El cultivo al que se le adicionó el sobrenadante de la cepa 5 presenta una D.O. final de 0.6 unidades.

El mismo efecto se observa en el ensayo realizado con la cepa 4 (la gráfica 7.3) donde la diferencia en la D.O. de crecimiento del cultivo al que se le adicionó el sobrenadante de la cepa 5 es de 0.4 unidades menos que la del cultivo testigo, una vez que ambos alcanzaron la fase estacionaria.

En este caso la sensibilidad de la cepa 4 solo es frente al sobrenadante de la cepa 5, debido a que el cultivo al que se le adicionó el sobrenadante de la cepa 2 no presenta diferencia notable en la D.O. a 600 nm con respecto al cultivo testigo.

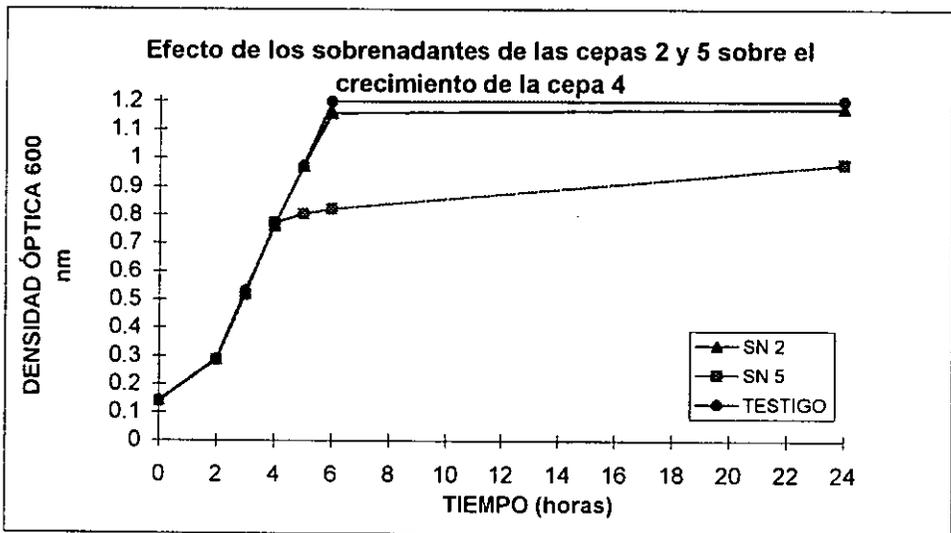


Fig. 7.3 Ensayo de mortalidad donde se muestra el efecto inhibitorio del sobrenadante de las cepas productoras de bacteriocina (130 UA / ml) sobre el crecimiento de la cepa 4. SN 2 = sobrenadante de la cepa 2; SN 5 = sobrenadante de la cepa 5

En lo que respecta al ensayo con la cepa 3, (fig. 7.4) se puede inferir que la sensibilidad de esta cepa es probablemente muy baja debido a que no hay inhibición en las horas inmediatas posteriores a la adición de los sobrenadantes. Solo hasta cuando la cepa llega a su fase estacionaria se hace evidente la presencia de un efecto inhibitorio representado por una ligera disminución en la D.O. a 600 nm.

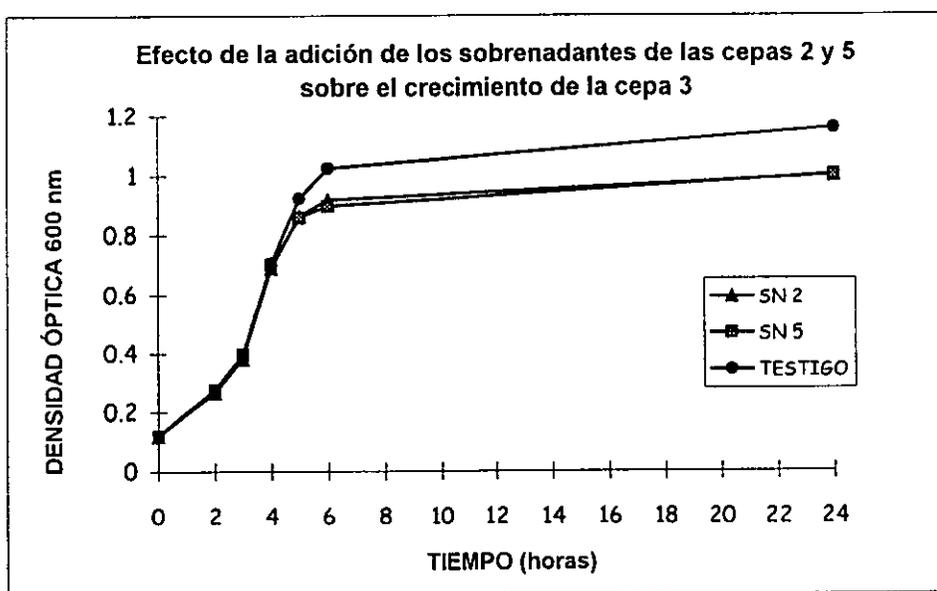


Fig. 7.4 Ensayo de mortalidad donde se muestra el efecto inhibitorio del sobrenadante de las cepas productoras de bacteriocina (130 UA / ml) sobre el crecimiento de la cepa sensible 3, adicionados a una D.O. de 0.7 unidades SN 2 = sobrenadante de la cepa 2; SN 5 = sobrenadante de la cepa 5

Por otra parte, los ensayos de autoinhibición de las cepas 2 y 5 se realizaron con el propósito de comprobar que el efecto observado en los ensayos anteriores era provocado por la presencia de la bacteriocina, ya que, según la definición de Tagg (1995), una bacteriocina es una sustancia de naturaleza proteica y sin efecto inhibitorio sobre la cepa que la produce, lo cual se comprueba en la fig. 7.5 que muestra que la cepa 2 no es autoinhibida ni presenta inhibición por el sobrenadante de la cepa 5. En cambio en la fig. 7.6 se puede ver que hay una pequeña disminución en la D.O. de crecimiento de la cepa 5 cuando fue tratada con el sobrenadante de la cepa 2 y sin embargo no hay autoinhibición.

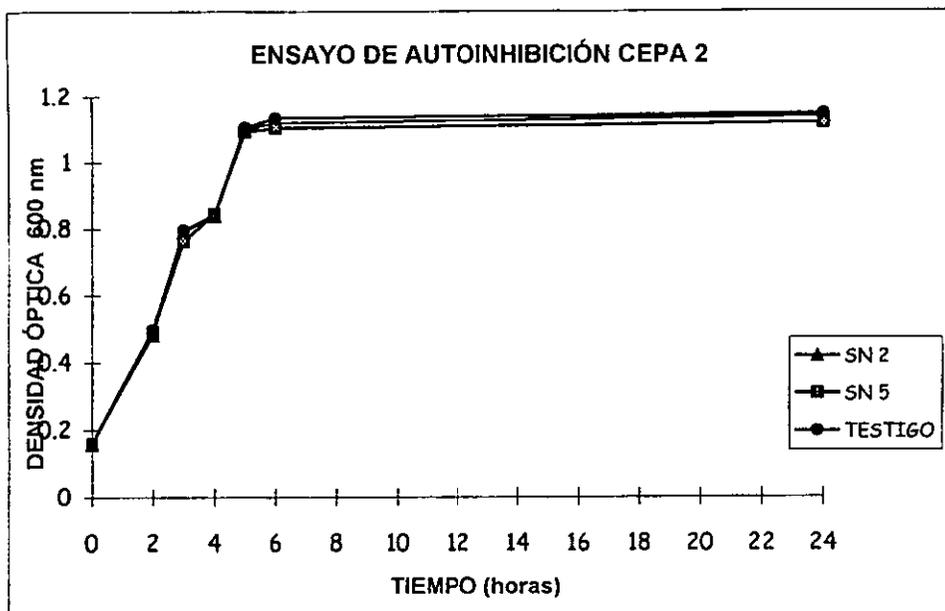


Fig. 7.5 Ensayo de autoinhibición donde se muestra el nulo efecto inhibitorio del sobrenadante de las cepas productoras de bacteriocina (130 UA / ml) sobre el crecimiento de la cepa 2, adicionados a una D.O. de 0.5 uni

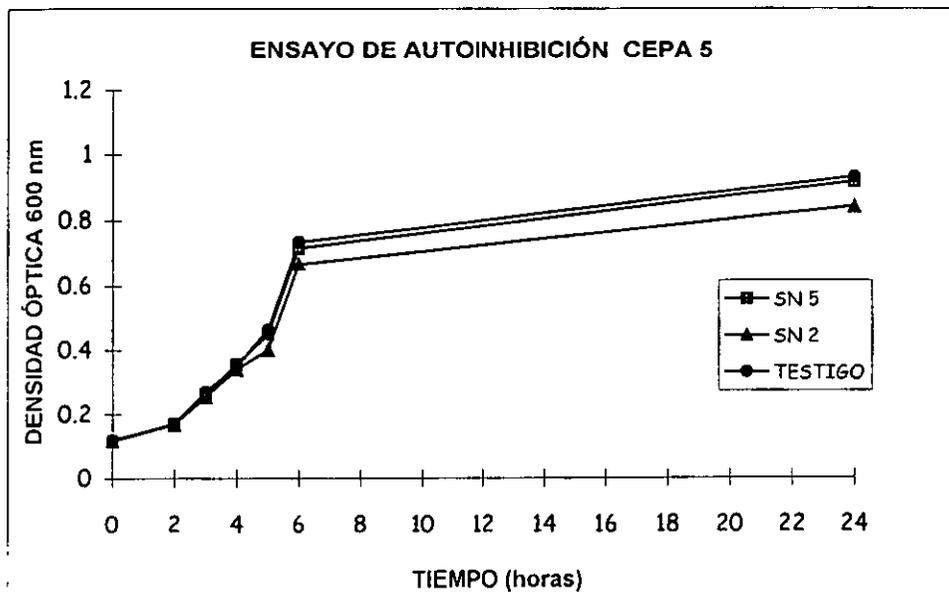


Fig. 7.6 Ensayo de autoinhibición donde se muestra el nulo efecto inhibitorio del sobrenadante de las cepas prod. de bacteriocina (130 UA / ml) sobre el crecimiento de la cepa 5, adicionados a una D.O. de 0.4 unidades.

Adicionalmente se realizaron estudios en el laboratorio (Guzmán, S. 1998) para comprobar que la bacteriocina L5 no es la misma que la nisina (bacteriocina de la cepa 2 usada como control positivo) para ello se realizó un espectro antimicrobiano, cuyos resultados se presentan a continuación:

Tabla IV. Comparación del espectro de actividad de las bacteriocinas L5 y nisina

Bacteriocina	L1	L5	Lp	LM3	MM2	Ps	B t	E c
L5	+	-	-	-	-	-	-	-
Nisina	+	+	+	+	+	-	+	-

Los signos positivos representan la inhibición de la cepa por la bacteriocina correspondiente y los signos negativos el caso contrario. Gram positivas L1 (*Lactococcus lactis* B-37), L5 (*Lactococcus lactis* L5), Lp (*Lactobacillus pentosus*), LM3 (*Lactobacillus plantarum* y *Micrococcus kristinae-variens*), MM2 (cepa en proceso de identificación) y Bt (*Brochothrix thermosphacta*). Gram negativas Ps (*Pseudomona fragi*), Ec (*Escherichia coli*).

En este estudio se encontró que la nisina tiene la capacidad de inhibir a todas las bacterias Gram positivas, que corresponden a las cepas de bacterias lácticas (L1, L5, Lp, LM3 y MM2) y *Brochothrix thermosphacta* (cepa indicadora de descomposición), mientras que en *Pseudomona fragi* y *Escherichia coli* (Bacterias Gram negativas) no se observó inhibición. Por otra parte L5 sólo inhibió a *Lactococcus lactis* L1.

Una vez establecido que la bacteriocina producida por la cepa 5 inhibía el crecimiento de varias cepas de *Lactococcus lactis* y que su espectro de actividad era diferente al de la nisina, se optó por estudiar y caracterizar esta proteína, por lo cual los estudios subsecuentes se centraron sólo en esta bacteriocina, a la que se le denominó L5. Se utilizó solo la cepa 1 como sensible debido a que sobre ésta se observa el efecto más claro y definido de inhibición.

### 7.3 OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN.

La optimización de las condiciones de producción de la bacteriocina L5 fue un punto clave para realizar los estudios posteriores de purificación y caracterización de esta proteína ya que la concentración en la cual originalmente se producía no era suficiente para obtener resultados confiables. Además de que se buscaba lograr una mayor producción, a la vez era necesario encontrar las condiciones más favorables económicamente hablando, ya que el interés por estudiar esta proteína es poder aplicarla comercialmente como bioconservador de alimentos.

A continuación se analizan los 3 parámetros con mayor repercusión en la producción de la bacteriocina L5 (ver anexo V :Esquema del fermentador)

#### 7.3.1 Efecto de la atmósfera gaseosa sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* 5.

En la gráfica 7.7 se comparan las cinéticas de crecimiento de la cepa 5 crecida en un fermentador de New Brunswick Scientific de 4 L.

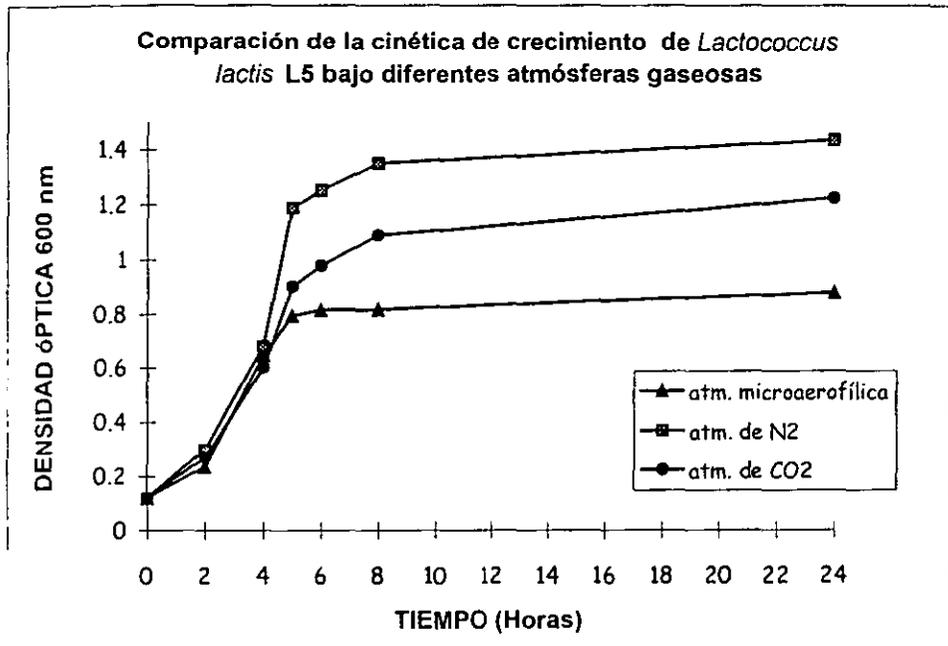


Fig. 7.7 Cinética de crecimiento de la cepa 5 en fermentador de 4 L. Condiciones de incubación: temperatura= 30°C, control de pH 5.5 agitación 200 r.p.m. Tiempo 24 h. atmósfera de nitrógeno

Las condiciones de crecimiento son iguales en todos los casos, excepto por la atmósfera gaseosa que se empleó. Se probaron 3 tipos de atmósfera gaseosa: microaerofílica, atmósfera de nitrógeno (100 ml/ min) y atmósfera de bióxido de carbono (100 ml /min).

La cinética de crecimiento a nivel fermentador presenta una fase lag muy pequeña, menor de dos horas, a diferencia de las cinética hecha a nivel matraz (fig 7.1). Se observa que el crecimiento de *Lactococcus lactis* 5 se favorece cuando la cepa es crecida bajo una atmósfera anaerobia de nitrógeno, ya que la D.O. (a 600 nm) de crecimiento en el fermentador con esta atmósfera es 1.75 veces mayor que la D.O. del cultivo crecido en atmósfera microaerofílica y 0.85 veces mayor con respecto al cultivo con atmósfera de dióxido de carbono.

La producción de la bacteriocina L5, en todos los casos, inicia durante la fase logarítmica de crecimiento temprana, y en la 4ª hora, cuando su D.O. es de alrededor 0.6, es posible detectar su actividad (fig. 7.8).

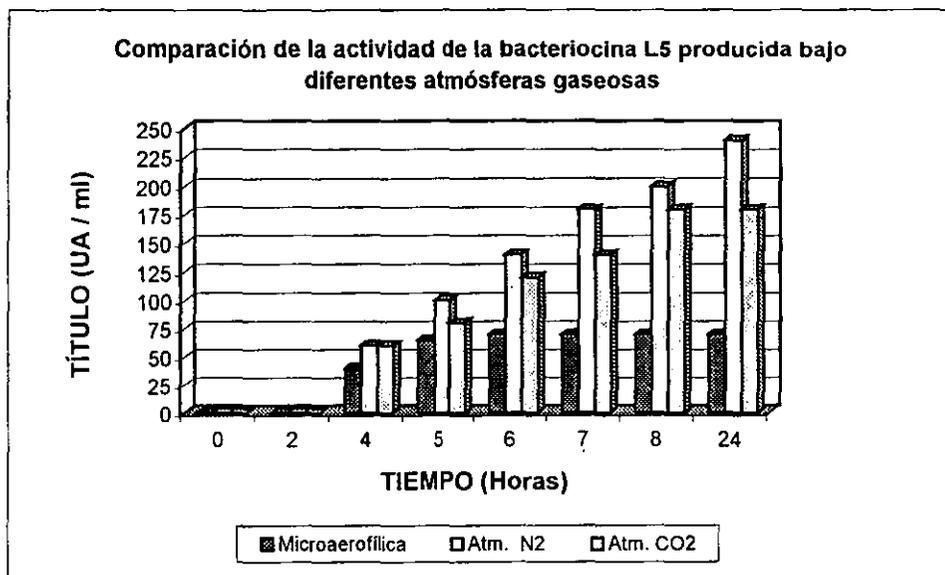


Fig. 7.8 Comparación de la actividad de la bacteriocina L5 producida bajo diferentes atmósferas gaseosas, en fermentador de 4L. Condiciones de incubación: temperatura 30°C, agitación 200 r.p.m. control de pH 5.5 La actividad se midió por el método de dilución hasta extinción en placas de agar, contra la cepa sensible 1.

A pesar de que en este punto los cultivos en las tres condiciones presentan una D.O. de crecimiento similar, la producción de la bacteriocina es menor en el cultivo crecido en atmósfera microaerofílica, mientras que los otros dos presentan una mayor producción, medida como UA / ml. En las horas subsiguientes hay un aumento más notable en las UA / ml del cultivo crecido en el fermentador con la atmósfera de nitrógeno, este aumento es proporcional al aumento en el número de células del cultivo (D.O. de la cepa 5).

Así el cultivo donde se obtiene la mejor producción es el de atmósfera de nitrógeno (230 UA/ml), siendo la diferencia de las unidades arbitrarias de 60 UA/ ml con respecto a la atmósfera de dióxido de carbono y 120 UA/ ml con respecto a la atmósfera microaerofílica.

### 7.3.2 Efecto del pH sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* 5

Las bacterias lácticas producen volúmenes muy grandes de ácido láctico al metabolizar los carbohidratos del medio en el que se encuentren. Este producto es excretado al exterior de la célula, provocando una disminución en el pH externo (Moat, 1985).

El efecto del pH de crecimiento sobre el cultivo de *Lactococcus lactis* 5 a nivel fermentador, se observa en la gráfica 7.9. El valor al que se controló el pH de uno de estos fermentadores fue de 5.5, según Meghrou (1995) quien propone que este valor de pH es el óptimo para la producción de las bacteriocinas del género *Lactococcus lactis*.

Las cinéticas de crecimiento de los fermentadores con pH controlado y pH sin controlar presentan un crecimiento muy similar en las primeras horas, debido a que el valor de pH que tienen está por encima de 5.5. Conforme avanza el tiempo el pH sigue disminuyendo en ambos casos, pero a partir de la 4ª hora, cuando el valor de pH llega a 5.5 se observa una ligera diferencia en la D.O. de crecimiento, siendo menor en el fermentador donde no se controló el pH. Finalmente la D.O. a las 24 h de este

fermentador es de 0.9 unidades, debido a que el pH en este fermentador sigue disminuyendo hasta llegar a un valor final de 4.4 unidades. Mientras que la D.O. final del fermentador con pH controlado es de 1.1 unidades.

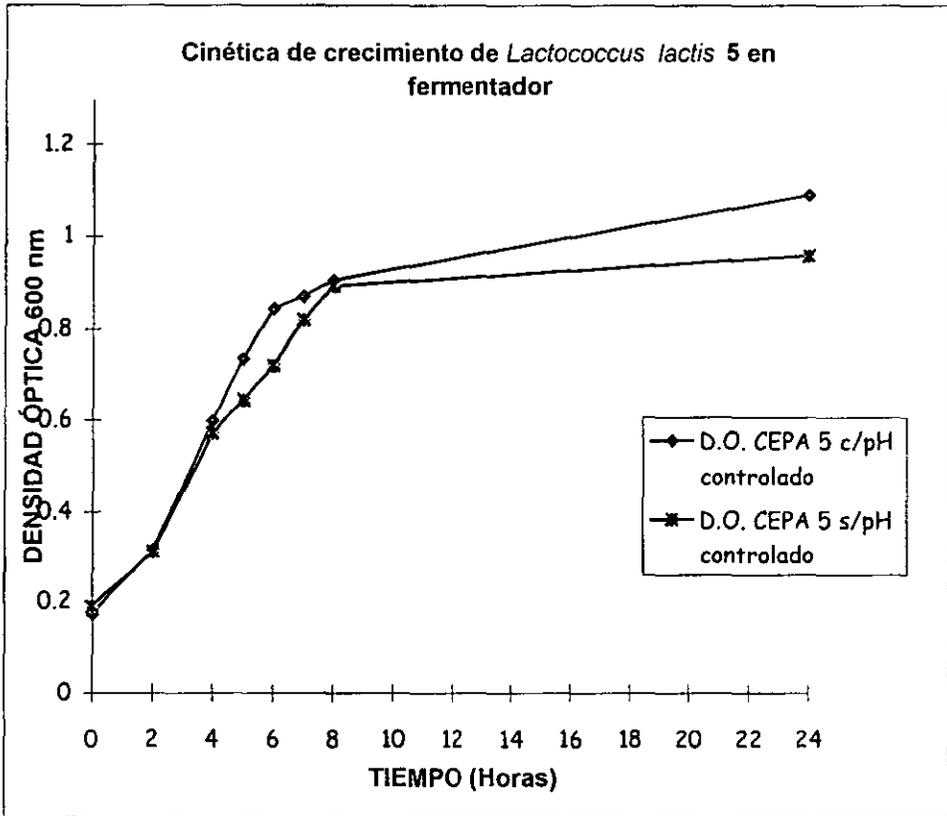


Fig. 7.9 Cinética de crecimiento de la cepa 5 en fermentador de 4 L. Condiciones de incubación: temperatura= 30° C, agitación 200 r.p.m. Tiempo 24 h. atmósfera de nitrógeno. Control de pH 5.5 y pH sin controlar

El pH de crecimiento influye en la producción de la bacteriocina. Cuando se comparó la actividad en los fermentadores no se observaron diferencias en las UA / ml hasta que el pH de crecimiento se encontró por debajo de 5.0 unidades, es decir, en el muestreo realizado a la 7ª hora, cuando se tenía un valor de pH en el medio de cultivo de 4.9, la actividad encontrada fue menor (fig. 7.10). Esta diferencia en la actividad se observa en las siguientes horas y hasta terminada la fermentación. Es importante

mencionar que aun cuando el pH del medio de cultivo inhibe la producción de la bacteriocina, su efecto no es suficiente como para cesar totalmente la producción.

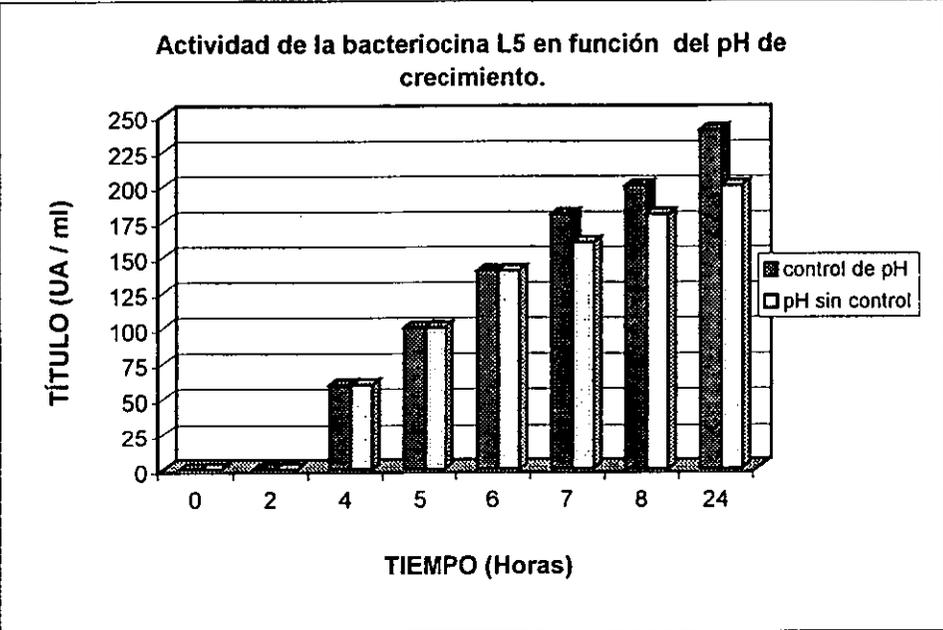


Fig. 7.10 Actividad de la bacteriocina L5 producida en fermentador de 4L con pH controlado en 5.5 y pH sin controlar. Condiciones de incubación: temperatura 30°C, agitación 200 r.p.m. atmósfera de nitrógeno La actividad se midió por el método de dilución hasta extinción en placas de agar contra la cepa sensible 1.

### 7.3.4 Efecto del tween 80 sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* 5.

Posteriormente, cuando se habían establecido los parámetros de control de pH y atmósfera gaseosa, se modificó la concentración del tween 80, el cual es uno de los componentes del medio de cultivo CGB. La función de este detergente iónico consiste en hacer más fluida la membrana de las células productoras con el fin de liberar fácilmente a la bacteriocina producida durante la fase logarítmica de crecimiento. Este parámetro se tomó en cuenta debido a que en estudios previos se había observado que la presencia de tween 80 en el medio de cultivo es indispensable para que la bacteriocina sea excretada por la célula.

El crecimiento de la cepa del cultivo que contenía tween 80 al 0.1 % (concentración usualmente utilizada en el medio de cultivo CGB) fue muy parecida a la cinética de crecimiento que se había observado en los fermentadores anteriores, llegando a un valor de D.O. de 1.15 unidades, tal como se muestra en la gráfica 7.11. Por el contrario, el crecimiento del cultivo con tween 80 al 1.0 % se abatió en un 23 % con respecto al anterior, lo cual significa que el tween 80 a concentraciones de 1.0 % afecta negativamente el desarrollo de la cepa productora, no obstante permite que sea liberado al medio una mayor cantidad de bacteriocina.

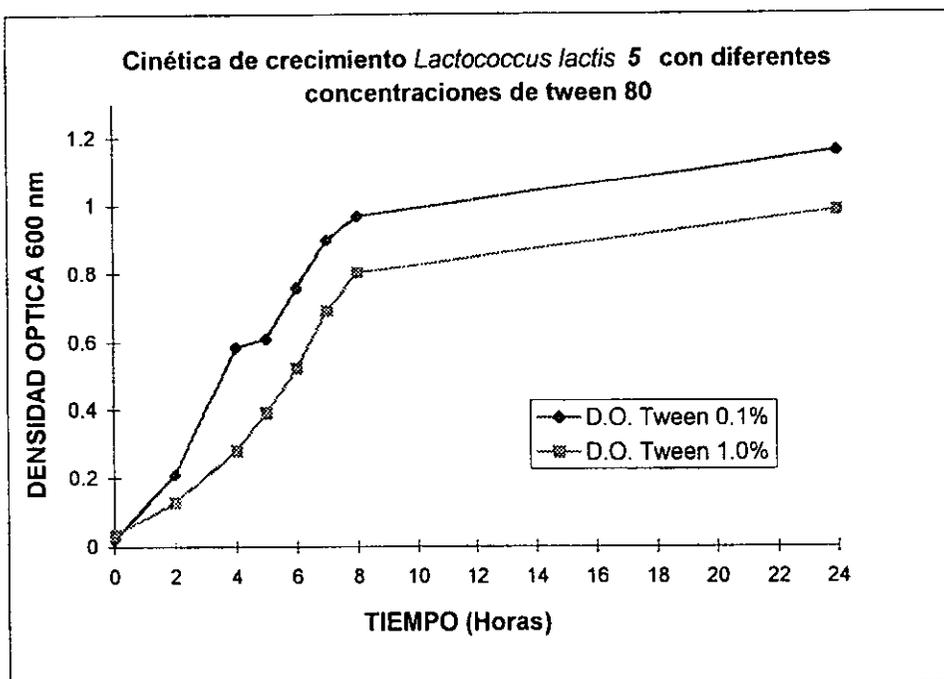


Fig. 7.11 Cinética de crecimiento de la cepa 5 en fermentador de 4 L. Condiciones de incubación: temperatura=30°C, agitación 200 r.p.m. Tiempo 24 h. atmósfera de nitrógeno. Control de pH 5.5 La actividad se midió por el método de dilución hasta extinción en placas de agar contra la cepa sensible 1.

La actividad se detectó, al igual que en los ensayos previos, a partir de la 4ª hora.

Esto se puede ver en la gráfica 7.12, donde se muestra que a pesar de que el número de células productoras, medidas como D.O. a 600 nm de crecimiento, era menor en el fermentador al que se le adicionó el tween 80 al 1.0%, se encontró una mayor actividad, la cual llegó hasta

valores de 320 UA / ml. Repitiéndose este mismo comportamiento durante todos los muestreos hasta terminada la fermentación a las 24 horas. Así se demuestra que la adición de una concentración 10 veces más de lo normal de tween 80 en el medio de cultivo, reporta grandes beneficios en el aumento de producción de la bacteriocina.

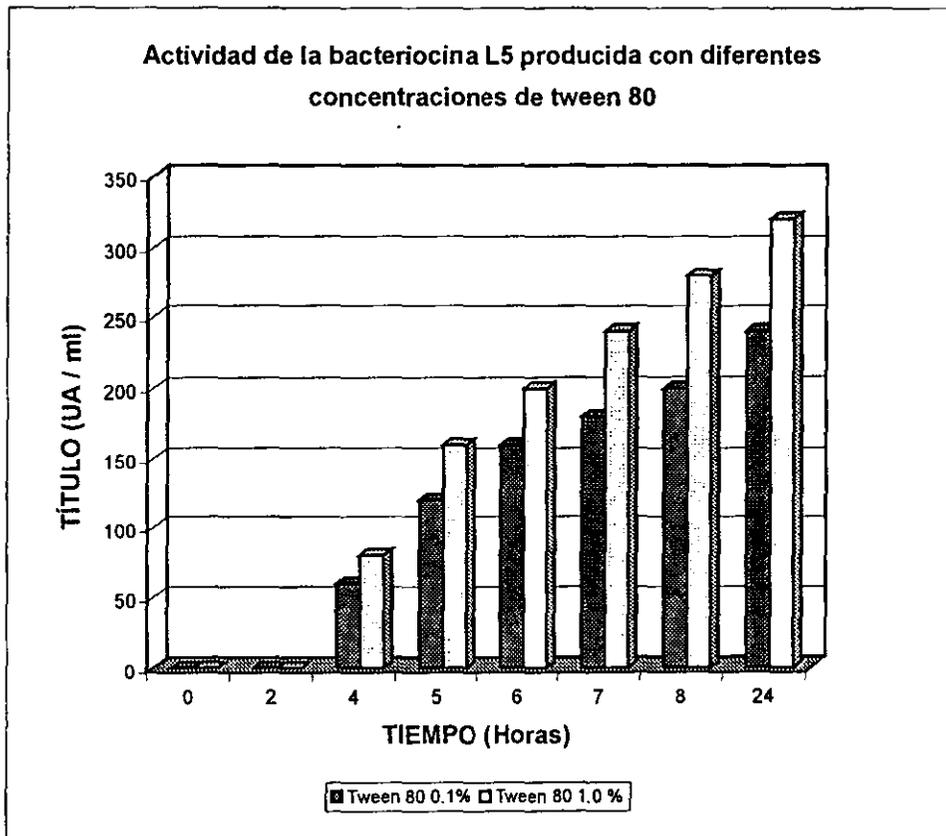


Fig. 7.12 Actividad de la bacteriocina L5 producida en fermentador de 4L con diferentes concentraciones de tween 80. Condiciones de incubación: temperatura 30°C, agitación 200 r.p.m. atmósfera de nitrógeno y control de pH 5.5. La actividad se midió por el método de dilución hasta extinción en placas de agar, contra la cepa sensible 1.

## 7.4 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA.

Los pasos generales de purificación deben contemplar el tipo de proteína de la que se trata con el fin de obtener una metodología óptima para ésta. En este caso se probaron varios protocolos de purificación diseñados para bacteriocinas producidas por cepas de *Lactococcus lactis* spp. , entre los cuales se encuentran los protocolos de Huot y col. (1995); Ali y col. (1995); Yang y col. (1992); Piard y col. (1990).

El protocolo inicialmente probado fue el diseñado por Huot y col. (1995), éste contemplaba como primer paso un tratamiento térmico a 100 °C / 15 min, debido a que la mayoría de las bacteriocinas de peso molecular bajo son termoestables. Sin embargo la bacteriocina L5 resultó ser sensible a esa temperatura. Posteriormente se probó el protocolo de Piard y col. (1992) el cual tiene el mismo fundamento que el método de Huot y col. (1995) pero adicionalmente utiliza una precipitación fraccionada, para lograr que la bacteriocina se precipitará entre un 60 y 80 % de saturación.

También era necesario conocer si toda la bacteriocina era excretada al medio o si existía una gran cantidad que quedaba retenida en la célula. Para ello se utilizaron dos protocolos el de Yang y col. (1992) y el de Ali y col. (1995) los cuales aunque tienen una metodología distinta, se basan en la adsorción dependiente del pH de la bacteriocina sobre la célula: la máxima adsorción ocurre a pH de 6.0 a 6.5, mientras que cuando el pH es muy ácido, alrededor de 2.0, esta proteína no se adsorbe, por tanto, la hipótesis que Yang y col. manejan es que si después de la fermentación el pH se ajusta al de la máxima adsorción (por ejemplo 6.0) y se remueven las células del sobrenadante con la proteína adsorbida, se podrá posteriormente remover el péptido de la superficie de celular a través de una disminución del pH entre 1.5 y 2.0, obteniéndose grandes cantidades de bacteriocina purificada.

Los cuatro protocolos de purificación se probaron con un cultivo de *Lactococcus lactis* 5 crecido en un fermentador de 4 L, bajo las siguientes condiciones: temperatura, 30 °C; control de pH, 5.5; agitación, 200 r.p.m.; atmósfera de nitrógeno (100 mL/min),

tiempo de fermentación 18 horas. Los resultados de los protocolos de purificación se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla V. Resultados de los protocolos de purificación parcial de la bacteriocina L5.**

Método*	Fundamento	Resultado
Huot y col. (1995)	Termorresistencia, precipitación de la proteína del sobrenadante	No es termorresistente a 100°C / 15 min
Piard y col. (1990)	Termorresistencia precipitación fraccionada 60 y 80 % de la proteína del sobrenadante	No es termorresistente a 100°C / 10 min
Ali y col. (1995)	Adsorción de bacteriocina a la membrana celular	No se adsorbe a la membrana celular a pH 6.0
Yang y col. (1992)	Termorresistencia, Adsorción de bacteriocina a la membrana celular	No es termorresistente a 70 °C / 25 min, no se adsorbe en la membrana celular a pH 5.8-6.2

\* Se encuentran divididos según el fundamento en que se basan y se explica el resultado obtenido en cada caso.

Estos protocolos preeliminares nos sirvieron de base para diseñar un nuevo protocolo de purificación. Así, en el protocolo de purificación modificado se trabajó exclusivamente con el sobrenadante, además de suprimir el uso de altas temperaturas. Se probaron diferentes concentraciones de sulfato de amonio, con el fin de conocer cual era la óptima. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla VI. Actividad de la bacteriocina L5 Precipitada con diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

Muestra	UA / ml
Sobrenadante (sin precipitar)	320
Precipitación al 20 %	480
Precipitación al 40 %	600
Precipitación al 60 %	1280
Precipitación al 80 %	1300

UA/ml= recíproco de la máxima dilución donde se encuentra actividad.

La concentración de sulfato de amonio donde se precipita la mayor cantidad de proteína (bacteriocina) fue al 80 % no obstante, se utilizó un porcentaje de saturación del 60 % debido a que la actividad de la bacteriocina, reportada como unidades arbitrarias / ml, aumentaba menos de 2% en la precipitación al 80%, lo cual significaba un gasto innecesario de reactivos.

Posteriormente se dializó la muestra en membranas de diálisis de 6000 a 8000 Da contra un buffer de fosfatos 25 mM pH 6.0, se realizó el título en el dializado y no se observó pérdida de actividad lo cual significa que la bacteriocina tiene un peso molecular mayor de 8000 Da.

Una vez dializada la muestra se realizó un paso más de purificación. El sobrenadante dializado se pasó a través de una columna de filtración en gel adaptada a un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC). La columna de gel filtración Sephadex G-25 separa los componentes de la muestra (dializado que contiene a la proteína cruda) que tengan un peso molecular menor de 300 KDa. El detector de arreglo de diodos Waters 994 fue utilizado en un intervalo de longitud de onda de 200 a 300 nm. Los cromatogramas fueron obtenidos a 280 nm y analizados mediante un software de computadora Millennium 2010.

Inicialmente se realizó un ensayo (fig. 7. 13) inyectando 500  $\mu$ L de muestra que contenía a la bacteriocina L5 con actividad de 320 UA / ml, obtenida de un

fermentador de 4 L, bajo las siguientes condiciones: medio CGB con tween 80 al 0.1%; temperatura, 30 °C; control de pH, 5.5; agitación, 200 r.p.m.; atmósfera de nitrógeno, tiempo de fermentación 18 horas y que posteriormente fue purificada parcialmente con el protocolo anterior. A una velocidad de flujo de la fase móvil de 0.25 ml/ min en un tiempo de corrida de 70 min. Las fracciones se colectaron cada dos minutos para realizar el ensayo de actividad.

Se pensaba que cualquier fracción cuyo peso molecular aparente fuera mayor de 8 KDa (ver Anexo VI: Cálculo de PM aparente) podría corresponder a la bacteriocina L5. Probablemente la fracción que estuviera en mayor porcentaje, en este caso 76.63 %, es decir la fracción cuyo tiempo de retención era de 27.78 min, correspondería a la bacteriocina. La única forma de corroborarlo era a través de una prueba de actividad (agar spot test, Schillinger and Lucke, 1989). A pesar de que esta prueba se realizó no solo con la fracción donde se observó el pico más alto, sino que también se realizó con todas las fracciones recolectadas cada dos minutos durante los 70 minutos de corrida, la prueba resultó negativa en todos los casos, lo que se puede deber a dos razones: 1) la bacteriocina pierde la actividad al ser manipulada durante un largo periodo, o 2) la bacteriocida fue diluida demasiado por lo cual no es posible observar inhibición alguna. La dilución es de al rededor de 30 veces, esto se calcula por el volumen inyectado / volumen total, es decir, 500  $\mu$ L / 17.5 ml.

Posteriormente se realizaron ensayos (fig. 7.14) inyectando 500  $\mu$ L de la misma muestra, a una velocidad de flujo de la fase móvil de 0.5 ml/ min en un tiempo de corrida de 30 min. El pico más grande de este cromatograma muestra tiempo de retención es de 15.533 min y un área del 61.67 % del total de la muestra. Además de una absorbancia de 0.64 a 280 nm y un peso molecular aparente muy alto, de alrededor de 73 KDa.

Este segundo cromatograma muestra un mayor número de fracciones que el primero, las cuales tienen pesos moleculares muy diversos, esto nos habla de la gran diversidad de proteínas y péptidos presentes en la muestra.

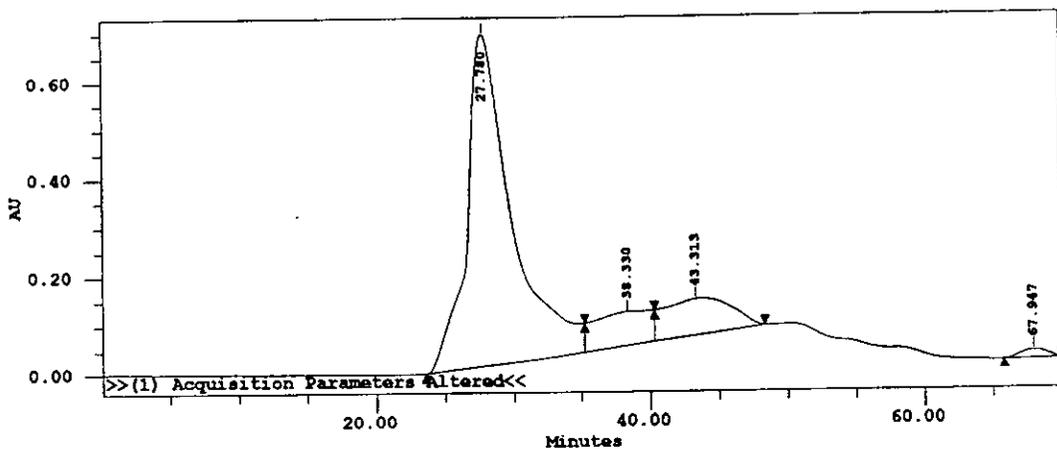


Fig. 7.13 Cromatograma de HPLC que muestra los diferentes componentes de una muestra que contiene bacteriocina L5. Condiciones: 500  $\mu$ L de muestra, velocidad de flujo de la fase móvil de 0.25 ml/min, tiempo de corrida, 70 min

**Tabla VII. Resultados de las fracciones del cromatograma de HPLC**

No. pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Kav	P.M. aparente (Da)
1	27.780	76.63	0.112	84384
2	38.330	9.75	0.331	63230
3	43.313	12.55	0.436	53038
4	67.947	1.07	0.956	3038

Ver anexo VI para el cálculo de Kav y PM aparente.

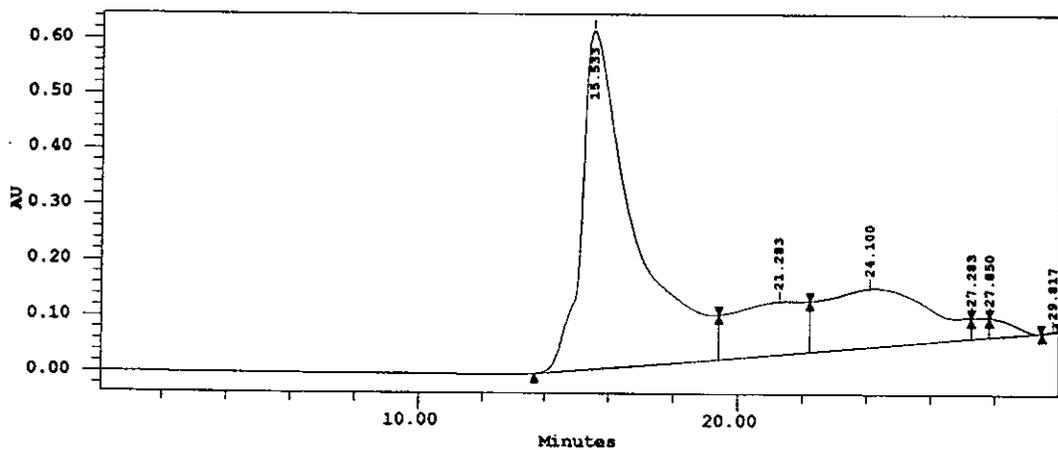


Fig. 7.14 Cromatograma de HPLC que muestra los diferentes componentes de una muestra que contiene bacteriocina L5. Condiciones: 500  $\mu$ L de muestra, velocidad de flujo de la fase móvil de 0.5 ml/min, tiempo de corrida, 30 min

**Tabla VIII. Resultados de las fracciones del cromatograma de HPLC**

No. pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Kav	P.M. aparente (Da)
1	15.533	61.71	0.220	73807
2	21.283	13.63	0.532	43807
3	24.100	22.01	0.683	29288
4	27.283	1.11	0.854	12846
5	27.850	1.51	0.884	9961
6	29.817	0.04	0.990	225

Ver anexo VI para el cálculo de Kav y PM aparente.

En el siguiente ensayo se utilizó una muestra de bacteriocina concentrada con actividad de 1280 UA / ml obtenida de un fermentador de 4 L, bajo las siguientes condiciones: medio CGB con tween 80 al 1.0 %; temperatura, 30 °C; control de pH, 5.5; agitación, 200 r.p.m.; atmósfera de nitrógeno burbujeado a 100 ml / min, tiempo de fermentación 18 horas y que posteriormente fue purificada parcialmente con el protocolo anterior. Se inyectaron 500 µL de muestra, a una velocidad de flujo de la fase móvil de 0.5 ml/ min en un tiempo de corrida de 70 min (fig. 7.15).

En este caso no es tan evidente la diferencia de una fracción más grande en este cromatograma, el cual tiene un área del 41.28 % del total de la muestra, con un tiempo de retención de 22.82 min y un peso molecular aparente de 94 KDa, a una absorbancia de 2.3 a 280 nm.

Los valores de PM aparente de las fracciones de este ensayo son mayores a los dos anteriores, debido probablemente a que las proteínas presentes se encuentran unidas al tween 80, por lo que el PM aumenta.

Por último, con base a los resultados anteriores, se pensó que la bacteriocina L5 es diferente a la nisina, única bacteriocina aprobada para ser usada en alimentos, por lo que se corrió una muestra que contenía esta proteína, para apoyar más esta idea. Las condiciones fueron las mismas, se inyectaron 500 µL de muestra, a una velocidad de flujo de la fase móvil de 0.5 ml/ min en un tiempo de corrida de 70 min. (fig. 16). Observándose varios picos con velocidades de retención mayores de 43 min, siendo el pico más alto el que tiene un área del 49.79 % y un tiempo de retención de 56.57 min, con un peso molecular aparente de 26 096 Da, bastante mayor al PM reportado para la nisina, el cual es de 3500 Da. La fracción que tiene un PM similar al reportado es el que tiene un tiempo de retención de 67.637 (última fracción) y un PM aparente de 3615 Da. Este resultado sustenta lo encontrado en los ensayos realizados durante la selección cruzada (sección 6.4) que indican que la bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* 5, denominada L5 no es la bacteriocina comercialmente utilizada, llamada nisina.

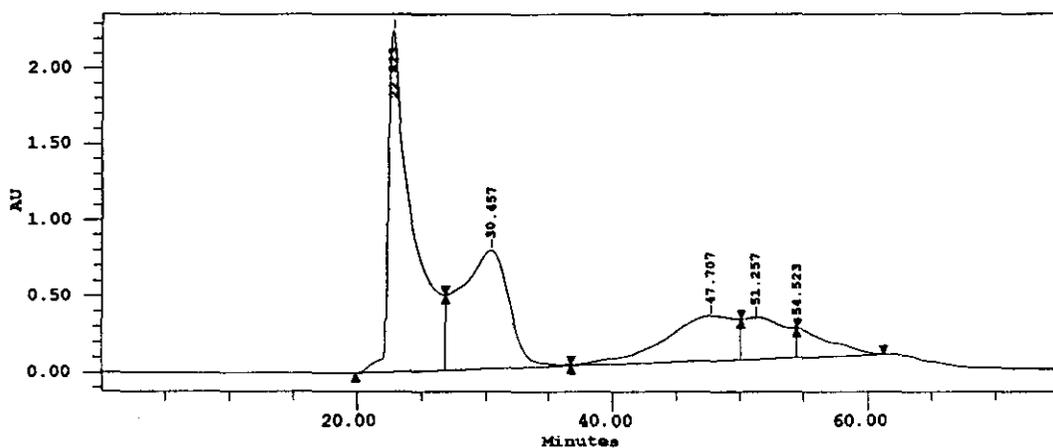


Fig. 7.15 Cromatograma de HPLC que muestra los diferentes componentes de una muestra que contiene bacteriocina L5. Condiciones: 500  $\mu$ L de muestra, velocidad de flujo de la fase móvil de 0.25 ml/min, tiempo de corrida, 70 min

**Tabla IX. Resultados de las fracciones del cromatograma de HPLC**

No. pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Kav	P.M. aparente (Da)
1	22.823	41.28	0.03	94673
2	30.457	29.23	0.164	79129
3	47.707	15.87	0.529	44096
4	51.257	8.94	0.604	36884
5	54.523	4.70	0.673	30250

Ver anexo VI para el cálculo de Kav y PM aparente.

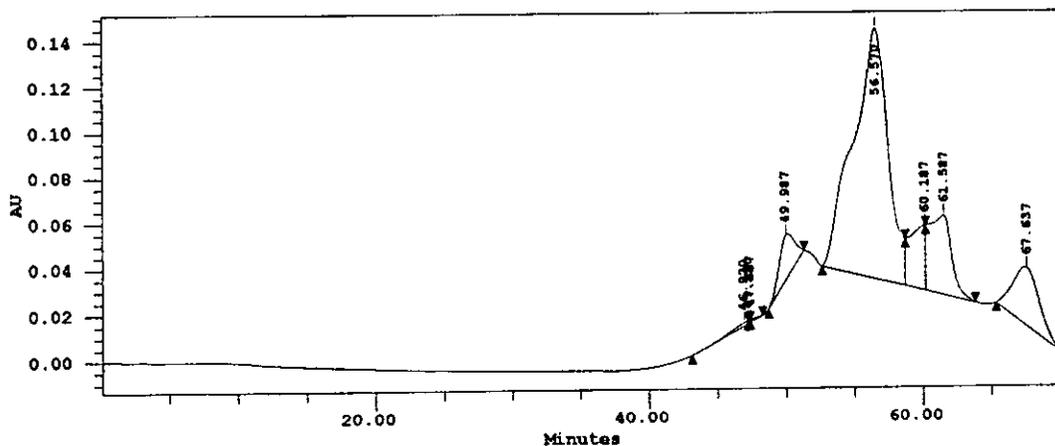


Fig. 7.16 Cromatograma de HPLC que muestra los diferentes componentes de una muestra que contiene nisina. Condiciones: 500  $\mu$ L de muestra, velocidad de flujo de la fase móvil de 0.25 ml/min, tiempo de corrida, 70 min

**Tabla X. Resultados de las fracciones del cromatograma de HPLC**

No. pico	Tiempo de retención (min)	% Área	Kav	P.M. aparente (Da)
1	46.920	0.26	0.512	45154
2	47.220	0.04	0.518	45153
3	47.387	0.10	0.522	44769
4	49.987	4.77	0.577	39480
5	56.570	63.91	0.716	26046
6	60.187	7.02	0.792	18807
7	61.587	13.03	0.819	16211
8	67.637	10.88	0.950	3615

Ver Cálculo de Kav y PM aparente en anexo VI.

## 7.5 CARACTERIZACIÓN DE LA BACTERIOCINA L5 A FACTORES FISICOQUÍMICOS COMO pH Y TEMPERATURA.

Esta prueba es una forma sencilla y rápida de conocer las características fisicoquímicas de la bacteriocina L5. Estos parámetros nos indican las condiciones óptimas para continuar los estudios posteriores de caracterización, así como los pasos de purificación subsecuentes.

Además, cuando se hayan hecho todas las pruebas necesarias, nos darán un indicio del ambiente ideal para la actividad antimicrobiana de la bacteriocina L5 y en consecuencia el tipo de productos alimenticios en los que se podría emplear como bioconservador.

Se realizaron pruebas fisicoquímicas que incluían la caracterización de la proteína a pH's ácidos (4.5 y 6.0), debido a que se sabía de ante mano que todas las bacteriocinas producidas por cualquier bacteria láctica son activas a valores de pH ácidos o cercanos a la neutralidad (Jack y col. 1995). También se probaron diferentes temperaturas.

El efecto del tratamiento térmico sobre la bacteriocina L5 confirmó la información que se tenía acerca de la termosensibilidad de esta proteína, encontrada durante su purificación parcial.

Se realizaron pruebas preeliminares para establecer la máxima temperatura a la que era resistente, probándose desde 25°C (temp. ambiente) hasta 100 °C. La temperatura máxima que resiste esta bacteriocina es de 40 °C. A esta temperatura se realizaron los ensayos de caracterización de pH y temperatura (fig. 7. 17).

Observamos que cuando la bacteriocina se encuentra a un pH de 6.0 resiste una temperatura de 40 °C hasta 15 minutos, sin embargo presenta una pérdida de actividad del 85 % y al llegar a los 20 minutos la actividad se ha perdido totalmente.

De manera similar, cuando se encuentra en un pH de 4.5 su resistencia disminuye hasta un 89 % cuando es tratada a 40°C por 15 minutos. Al igual que en el caso anterior, la bacteriocina sufre una pérdida total de actividad a los 20 minutos.

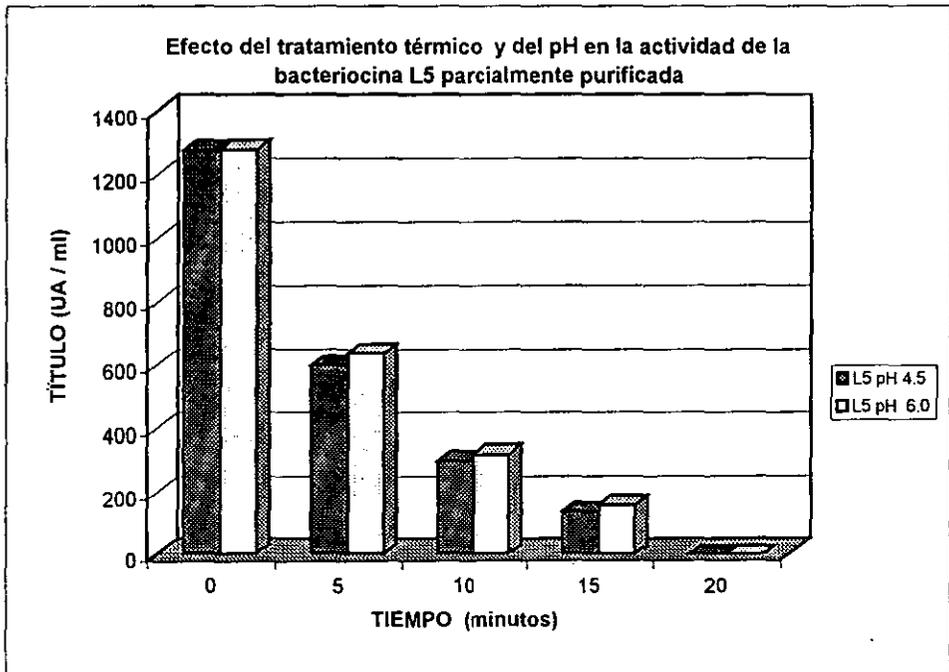


Fig. 1.17 Efecto de la temperatura y el pH en la actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 parcialmente purificada. La temperatura a la cual se llevó a cabo este ensayo fue de 40°C, establecida como la máxima temperatura en que la bacteriocina L5 presenta actividad. Las muestras se ensayaron a dos pH's 4.5 y 6.0

Adicionalmente se realizaron pruebas donde se observa el efecto de las bajas temperaturas sobre la bacteriocina L5. Se eligieron dos temperaturas, una de refrigeración (4°C) otra de congelación (-20°C), esta elección se fundamentó en el hecho de que la bacteriocina no es termorresistente, por lo cual se debían buscar temperaturas alternativas que pudieran estar acorde con el tipo de alimentos en los que la proteína se pudiera emplear, después de todas las pruebas necesarias, como bioconservador. Así como las condiciones bajo las cuales se pueden continuar los estudios de caracterización y purificación subsecuentes.

En las gráficas 7.18 y 7.19 se muestra como la temperatura de refrigeración y congelación, respectivamente, afectan la actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 sobre la cepa sensible 1.

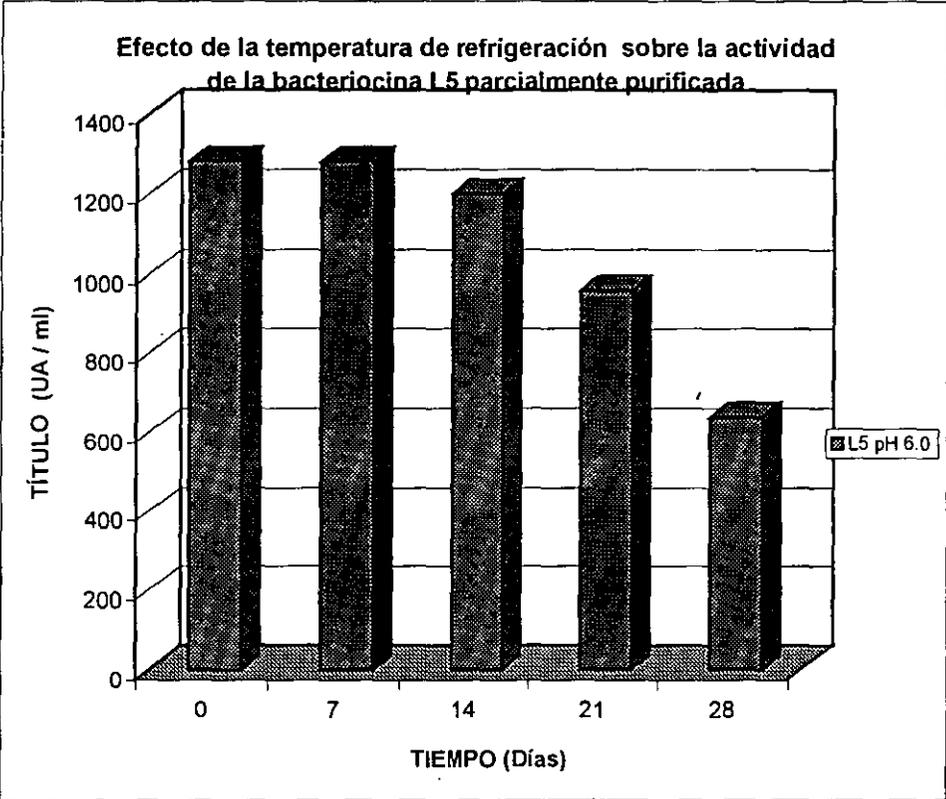


Fig. 7.18 Efecto de la temperatura de refrigeración (4 °C) sobre la actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 parcialmente purificada. El pH de la muestra de bacteriocina fué únicamente de 6.0

El efecto de la temperatura de refrigeración nos deja claro que la bacteriocina L5 es una fuerte candidata a ser utilizada como bioconservador en alimentos refrigerados ya que su actividad permanece en un 96.72 % después de 14 días a 4°C con un pH de 6.0 y disminuye a la mitad del original solo después de 28 días (fig. 7.18).

De la misma forma, bajo temperaturas de congelación esta bacteriocina resulta ser muy estable, puesto que después de 72 días de congelación la bacteriocina no presenta ninguna modificación en los valores de actividad, reportados como UA / ml. (fig. 7.19). Solo hasta transcurridos 98 días se hace evidente la disminución de la actividad inhibitoria sobre la cepa sensible 1 hasta valores de 380 UA / ml.

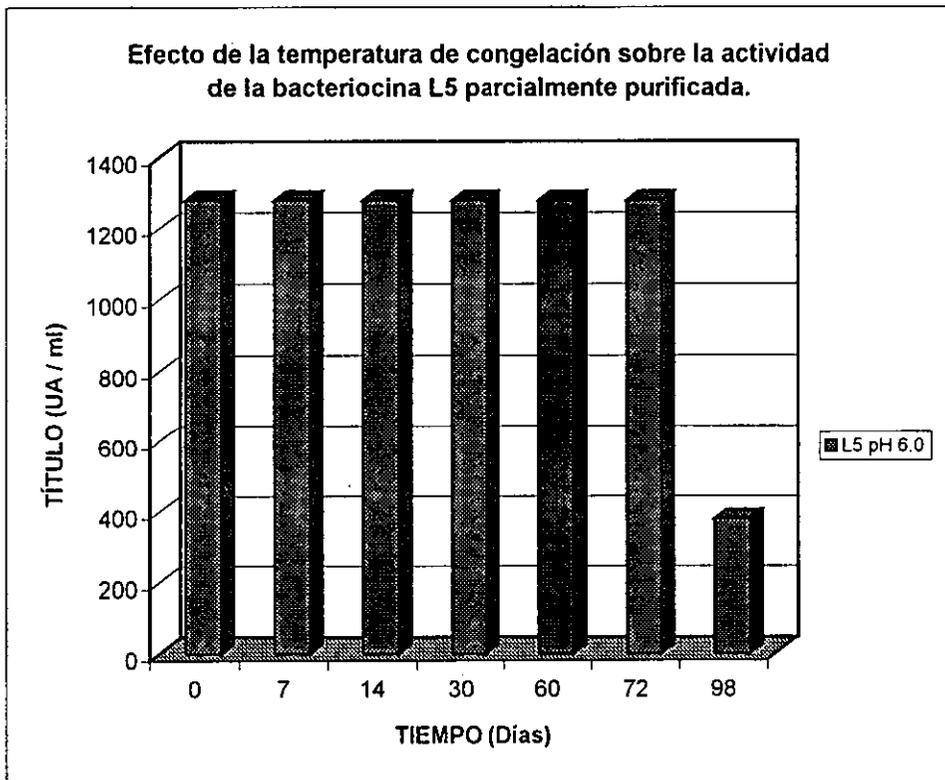


Fig. 7.19 Efecto de la temperatura de congelación (-20 °C) sobre la actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 parcialmente purificada. El pH de la muestra de bacteriocina fué unicamente de 6.0

## 7.6 ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LA BACTERIOCINA L5 PARCIALMENTE PURIFICADA.

La actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 ya había sido establecida con los sobrenadantes del cultivo de *Lactococcus lactis* 5. Esta actividad bactericida se había estado observando implícitamente desde el inicio de los experimentos. En esta última sección se cuantificó de manera más exacta la actividad inhibitoria de la bacteriocina L5 parcialmente purificada sobre el crecimiento de la cepa de *Lactococcus lactis* B-37, (cepa 1 sensible) siguiendo la evolución de la D.O. a 600 nm después de un tratamiento con la bacteriocina parcialmente purificada (1280 UA / ml), así como el cultivo al que se le adicionó la bacteriocina cruda (320 UA/ml) y el cultivo testigo. (fig. 7.20).

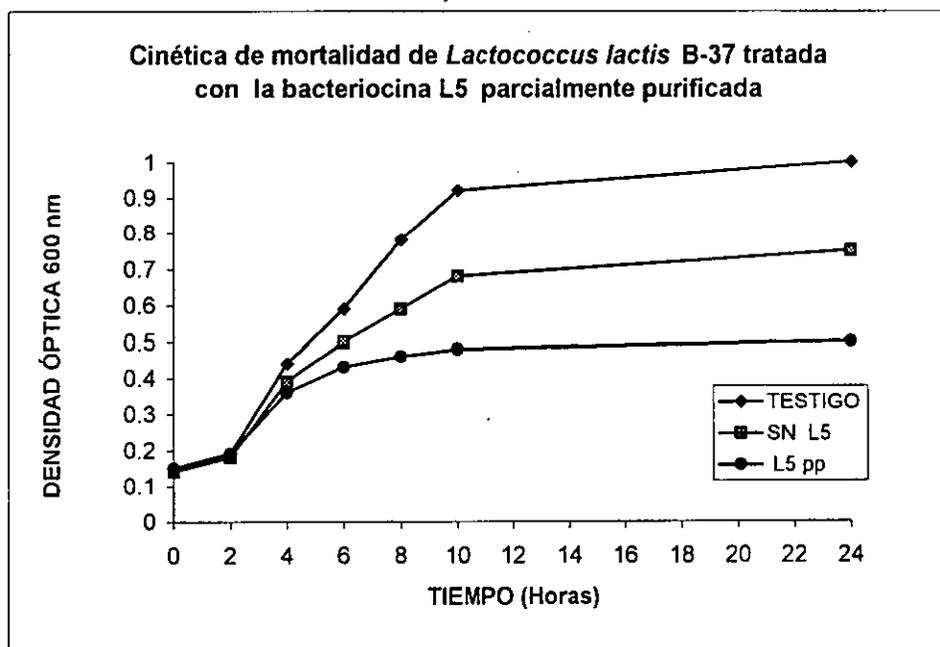


Fig. 7.20 Cinética de mortalidad de la cepa sensible 1. Cultivo tratado con 1 ml de bacteriocina parcialmente purificada (1280 UA/ml) adicionada en la cuarta hora de crecimiento (D.O. 0.4 unidades). También se muestran las curvas de mortalidad de un cultivo al cual se le adicionó sobrenadante que contenía a la bacteriocina cruda (320 UA/ml) y el cultivo que sirvió como testigo.

SN L5 sobrenadante que contiene a la bacteriocina cruda; L5 pp = bacteriocina parcialmente purificada.

Testigo= cepa 1 a la cual no se le adicionó bacteriocina L5

En esta cinética de mortalidad se observa un crecimiento muy similar en los tres cultivos, durante la primera fase de crecimiento (fase lag) y hasta el tiempo anterior a la adición de la bacteriocina. Esta adición ocurre una vez iniciada la fase logarítmica de crecimiento, a la 4ª hora. En este punto, se ve claramente que la bacteriocina L5 producida por *Lactococcus lactis* 5 actúa unos cuantos minutos después del contacto con la cepa sensible 1, ya que en la gráfica 7.20 observamos diferencias en la D.O. de crecimiento a la cuarta hora, debido a que la lectura en el espectrofotómetro se hizo después de haber adicionado la bacteriocina parcialmente purificada, así como el sobrenadante crudo.

Este efecto es obviamente más claro en el cultivo con la bacteriocina parcialmente purificada puesto que su actividad es cuatro veces mayor a la encontrada en el sobrenadante que contiene a la bacteriocina cruda. Por el contrario el crecimiento del cultivo testigo sigue su curso normal.

En las horas posteriores a la adición el efecto de la bacteriocina se hace más evidente y cuando los cultivos llegan a la fase estacionaria las diferencias en la D.O. a 600 nm con respecto al cultivo testigo, son de 0.7 unidades de absorbancia en el cultivo al que se le adicionó la bacteriocina parcialmente purificada y 0.3 unidades en el cultivo inhibido por la bacteriocina cruda.

Por otra parte, el efecto de la bacteriocina L5 en la viabilidad de *Lactococcus lactis* B-37 (cepa 1) en cultivo líquido (fig 7.21), muestra que el crecimiento de la cepa sensible se ve afectado desde el momento en que se adiciona la bacteriocina, es decir a la cuarta hora, observándose una disminución de una unidad logarítmica en las unidades formadoras de colonia (UFC) en el cultivo al que se le adicionó la bacteriocina parcialmente purificada. Mientras que en el cultivo al que se le adicionó la bacteriocina cruda, no se aprecia una disminución muy grande.

Finalmente se alcanza una diferencia en el crecimiento de la cepa 1 de  $3 \times 10^{11}$  UFC / ml en el cultivo testigo y  $9 \times 10^9$  UFC / ml en el cultivo al que le fue adicionada

la bacteriocina parcialmente purificada. Esto significa que existe una diferencia en el número de unidades formadoras de colonia /ml de alrededor de 1.5 unidades logarítmicas a las 24 horas de iniciado el crecimiento de la cepa 1.

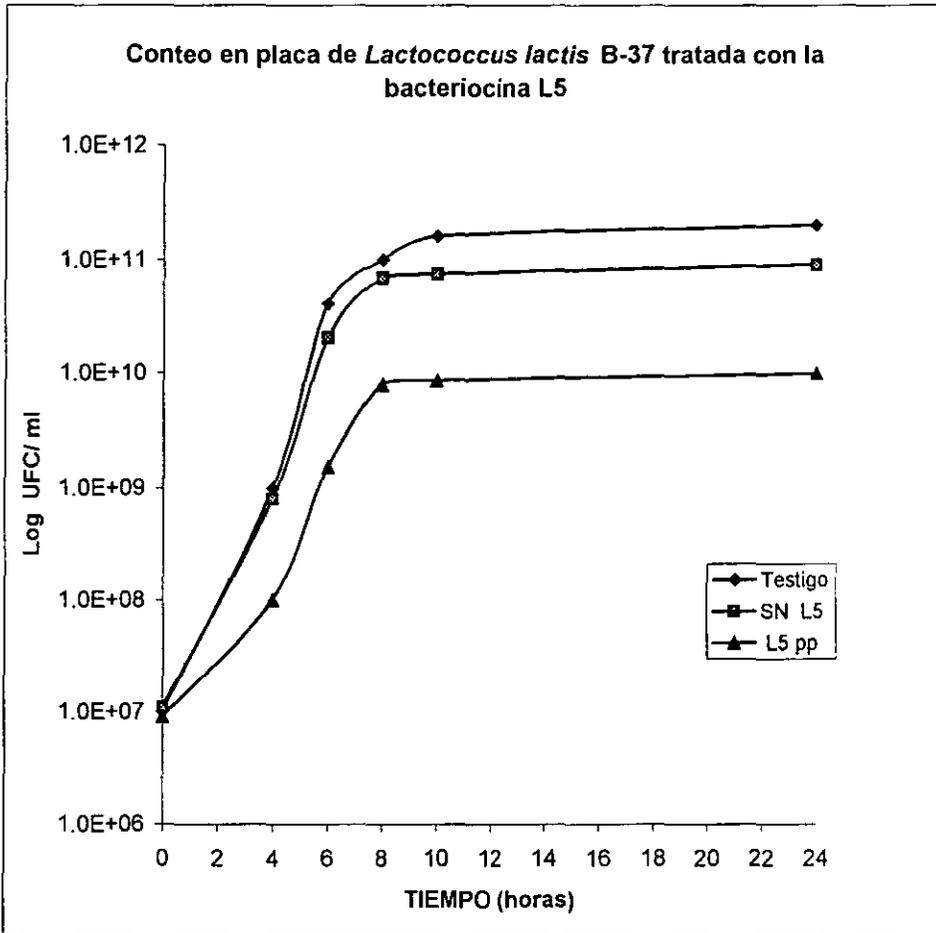


Fig. 7.21 La viabilidad de la cepa sensible se modificó cuando fue tratada con la bacteriocina L5. SN L5 = sobrenadante que contiene a la bacteriocina L5 cruda, L5 pp= bacteriocina parcialmente purificada, Testigo= cepa 1 a la cual no se le adicionó bacteriocina L5

## 8. DISCUSIÓN.

La conservación de los alimentos es una de las principales metas para la superación de los problemas mundiales de desabasto y hambruna. Diversas formas de conservar un alimento se han utilizado. Ejemplo de ello son las técnicas de deshidratación, refrigeración, congelación, calor, irradiaciones y por supuesto, el empleo de conservadores.

Existen diferentes tipos de conservadores, entre ellos se encuentran los químicos (tal es el caso de los ácidos benzoico, propiónico y sórbico) y los llamados conservadores naturales o bioconservadores. Estos bioconservadores son definidos como sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, las cuales son inocuas.

Con el desarrollo de los procesos biotecnológicos se han llevado a cabo muchas investigaciones sobre este tipo de sustancias y en especial, el estudio se ha centrado en las llamadas bacteriocinas.

Así, las bacteriocinas de bacterias ácido-lácticas presentan características que les permiten ser consideradas como potenciales conservadores en alimentos, debido a su acción bactericida frente a bacterias contaminantes Gram positivas y a su inactivación por proteasas del tracto gastrointestinal, lo cual asegura su inocuidad al ser consumidas.

Este estudio comenzó con una selección cruzada, que inicialmente incluía 11 cepas de bacterias lácticas, y que posteriormente se redujo a cinco cepas del género *Lactococcus*. La elección de estas cinco cepas se basó en su capacidad para producir bacteriocinas (cepas 2 y 5) y su sensibilidad frente a estas (cepas 1, 3 y 4).

Los resultados de este estudio mostraron que la cepa de *Lactococcus lactis* BM-B-337 (cepa 5) produce un metabolito extracelular, durante su fase logarítmica de crecimiento, que inhibe el desarrollo de algunas cepas de bacterias lácticas taxonómicamente relacionadas (cepas 1, 3 y 4).

La producción de la bacteriocina fue hecha en condiciones microaerofílicas, para evitar la formación del peróxido de hidrógeno, el cual reacciona con el ion superóxido, liberando radicales hidroxilo, los que son capaces de oxidar los lípidos de la membrana

celular, además de alterar su material genético, provocando, de esta manera la muerte celular de la cepa sensible (Gould, 1991). Esta precaución se tomó con el fin de evitar que se obtuvieran falsos positivos.

La actividad antibacteriana no fue el resultado del efecto de los ácidos orgánicos producidos por la mayoría de las bacterias lácticas, incluido el género *Lactococcus*, perteneciente al grupo de las bacterias lácticas, el cual es homofermentativo, lo que significa que utiliza la vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) para metabolizar la glucosa principalmente a ácido láctico. (Kluyver, 1931 en Shirai, 1996). Este efecto fue controlado al neutralizar los ácidos orgánicos presentes en el sobrenadante del cultivo de esta cepa, con NaOH 0.1 N, a un pH de 6.0, donde la bacteriocina es estable, pues recordemos que las bacteriocinas de bacterias ácido lácticas solo tienen actividad antibacteriana cuando el pH de su ambiente es ácido o cercano a la neutralidad (Jack, 1995).

También es importante mencionar que con el método de dilución hasta extinción, con el cual se midió la actividad antimicrobiana de la bacteriocina, nos asegura que el efecto inhibitorio que se observa tampoco es debido a la presencia de bacteriófagos, puesto que el incremento en las diluciones de la bacteriocina se observó en las capas de agar como halos de inhibición más pequeños. En cambio, si el responsable del efecto fuera un bacteriófago, en las placas de agar no se hubieran observado diferencias en el tamaño de los halos de inhibición cuando se incrementaron las diluciones de las muestras del sobrenadante de *Lactococcus lactis* 5.

Por otra parte, en estudios preeliminares realizados en el laboratorio se encontró que la sustancia que producía la cepa de *Lactococcus lactis* 5 era sensible a la acción de las enzimas tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina. Este es un punto importante ya que uno de los dos criterios para denominar a una sustancia antimicrobiana como bacteriocina, es necesario que sea de naturaleza proteica, al respecto Tagg (1976) menciona que: las bacteriocinas deben ser proteínas y que si la actividad de la sustancia es inhibida por

una o más proteasa entonces es prueba suficiente de que el inhibidor microbiano es de naturaleza proteica.

Con las pruebas anteriores y el hecho de que presentaba un espectro de actividad estrecho solo con cepas relacionadas, pudimos considerar a este metabolito de actividad antagonista como una bacteriocina, a la que denominamos bacteriocina L5.

El primer punto que consideramos necesario fue el conocer las características de desarrollo de las cinco cepas involucradas en el estudio, por ello se realizaron las cinéticas de crecimiento. Estas cinéticas nos proporcionaron información necesaria sobre el desarrollo de las cepas, incluyendo la duración de las 3 fases de crecimiento y el número máximo de células que alcanzaban, medido en función de la densidad óptica (D.O. a 600 nm) de crecimiento. Así como la cantidad de ácidos orgánicos que producían y que, por tanto resistían. Este último parámetro fue medido en función del pH de crecimiento.

A pesar de que la forma más sencilla de visualizar la actividad inhibitoria de cualquier compuesto producido por algún microorganismo es a través de pruebas en placas de agar, en el caso de la bacteriocina L5 la prueba de los pozos de agar, (Schillinger and Lücke, 1989), se realizaron las pruebas de mortalidad de las cepas 1, 3 y 4 con el fin de conocer con precisión el efecto que se tenía sobre el crecimiento de las cepas sensibles, puesto que el monitoreo de la actividad inhibitoria en cultivo líquido nos permite mantener las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa sensible (Hoover, 1993) y de esta forma conocer la verdadera capacidad inhibitoria de la bacteriocina.

Los resultados de este ensayo nos indicaron que las cepas 1,3, y 4 a pesar de ser cepas del mismo género presentaban diferentes grados de inhibición, siendo la de mayor sensibilidad la cepa 1, por lo cual fue con esta cepa con la que se realizaron los estudios posteriores.

Además de ello, se realizaron pruebas de autoinhibición con las cepas 5 y 2, esta última utilizada como control positivo productor de bacteriocina ya que de antemano se sabía que la sustancia antimicrobiana producida por la cepa de *Lactococcus lactis subsp. lactis* BM-B-147 (cepa 2), es la única bacteriocina aprobada para ser usada en alimentos como bioconservador. A esta bacteriocina se le conoce con el nombre de nisina.

En esta prueba comprobamos el otro criterio indispensable para denominar bacteriocina a una sustancia antimicrobiana producida por cualquier microorganismo. Este criterio se refiere a su auto-inmunidad, término definido como la nula actividad que la bacteriocina debe presentar contra las células que la producen, (Konisky, 1982). En dicha prueba de autoinhibición, se midió la actividad antimicrobiana que los sobrenadantes que contenían a las bacteriocinas de las cepas 2 y 5 pudieran tener contra su cepa productora y contra la otra cepa productora de bacteriocinas. Como se esperaba, la bacteriocina L5 no inhibió el crecimiento de su cepa productora (cepa 5) ni de la cepa 2. De igual forma, la bacteriocina producida por la cepa 2 inhibió a su cepa productora ni a la cepa 5. Estos resultados nos ayudan a reforzar la conclusión a la que se había llegado desde antes, esto es, que la sustancia antimicrobiana que produce *Lactococcus lactis* BM-B-337 (cepa 5) es un bacteriocina. También es posible deducir de estos resultados que las bacteriocinas producidas por las cepas 2 y 5 no son iguales pues, los grados de inhibición que presentan frente a las cepas 1, 3 y 4 son distintas.

Para las pruebas posteriores de purificación y caracterización de la bacteriocina L5 era necesario optimizar su producción, puesto que las concentraciones en las que se producía en el matraz no eran suficientes. Por ello se escaló la producción de la bacteriocina a nivel fermentador y se observó el efecto que tenía la atmósfera gaseosa, el control de pH y la adición de una concentración mayor de tween 80 sobre el crecimiento de la cepa 5 y, lo más importante, sobre la producción de la bacteriocina. Para, de esta manera, establecer las condiciones óptimas de crecimiento. Las bacterias lácticas son consideradas como anaeróbicas o microaerófilicas (Shirai, 1996), por esta razón resultaba importante utilizar una atmósfera gaseosa adecuada.

Se contaban con varias opciones. La condición microaerofílica, era la más simple, consistía en cerrar todas las entradas de gas al fermentador, solo se tendría el aire contenido en es momento en la jarra de fermentación. Se esperaba que se obtuviera una buena producción bajo esta condición, pues ésta era la menos costosa. Desafortunadamente las condiciones microaerfílicas variaban constantemente debido a que para poder tomar muestras del cultivo cada determinado tiempo era necesario inyectar aire a la jarra de fermentación. El resultado de ello, fue que se obtuvieron bajos niveles de producción, debidos al bajo crecimiento que tuvo el cultivo crecido bajo estas condiciones. Las otras dos opciones consistían en inyectar gas nitrógeno y bióxido de carbono para mantener condiciones anaeróbicas. El nitrógeno es un gas inerte que de ninguna manera puede ser aprovechado por las bacterias lácticas, incluidas las del género *Lactococcus*, su efecto en este estudio solo consistió en generar condiciones anaerobias.

Al revisar los resultados obtenidos cuando se crecía en ambas condiciones observamos que la mejor opción era la atmósfera de nitrógeno, por lo cual los siguientes estudios se realizaron en fermentadores crecidos en una atmósfera gaseosa de nitrógeno. Se ha reportado que el control de pH es un factor necesario para mejorar la producción de la bacteriocinas producidas por el género *Lactococcus* (Meghrou, 1995). El valor de pH al cual se debe controlar el crecimiento es de 5.5 unidades. Por esta razón se crecieron las cepas en condiciones controladas y condiciones sin controlar.

Efectivamente, mientras el valor de pH no se encuentra por debajo de 5.5 la producción de la bacteriocina no se ve afectada pues se mantenía igual en cada uno de los fermentadores, pero una vez que este valor empieza a descender, la producción se ve mermada.

Se cree además que la producción de los ácidos orgánicos, las bacteriocinas y otros metabolitos con capacidad antimicrobiana son producidos por las bacterias lácticas como una forma combinada de acción contra las cepas con las que compiten por el sustrato, por lo que se cree que la respuesta de la célula productora al control de

pH en 5.5 es la de producir más la bacteriocina en mayor cantidad para contrarrestar el efecto del pH, que no es tan ácido en el entorno.

Los resultados encontrados en este estudio concuerdan con lo establecido por Meghrous (1995) en cuyo estudio se afirma que el tween 80, uno de los componentes del medio de cultivo CGB, es un detergente iónico que funciona permitiendo que la membrana celular sea más fluida, por lo cual será más fácil la liberación de la bacteriocina al medio. Así, apesar de que la concentración al 1.0 % parece afectar la viabilidad de la cepa productora, se obtiene una mayor concentración de bacteriocina y esto es definitivamente debido a que fue posible liberar una mayor cantidad de bacteriocina contenida en la célula productora.

Una vez definidos los parámetros de crecimiento de la cepa 5, donde la producción de la bacteriocina era la más adecuada, se purificó parcialmente a esta proteína. Se debía establecer si la bacteriocina iba a ser recuperada del sobrenadante o de la célula productora, por lo que se probaron diversos protocolos de purificación. En ese momento no se sabía que la bacteriocina L5 no es termorresistente por lo cual fue necesario establecer un protocolo modificado, el cual utilizaba el sobrenadante para obtener la bacteriocina.

La precipitación por salado es uno de los pasos generales cuando se quiere concentrar una proteína que se encuentra muy diluida. Aun así era necesario conocer el porcentaje de sulfato de amonio (sal empleada para la precipitación) con el que precipitaba la proteína, el valor ideal encontrado fue del 60 %.

El siguiente paso necesario, consistía en dializar la proteína precipitada con el fin de eliminar las sales. Para ello se empleó una membrana con tamaño de poro de 6000 a 8000 Da y puesto que se encontró actividad se infirió que la bacteriocina L5 tenía un peso molecular mayor de 8000 Da.

Posteriormente se pasó la muestra por una columna de gel filtración adaptada a un sistema de HPLC. Con esto se aseguraba la separación de los componentes de la muestra, basados en su peso molecular con ayuda de la columna de gel filtración.

Los resultados encontrados en los cromatogramas revelan varias fracciones importantes que podrían pertenecer a la bacteriocina L5. Este sería un paso decisivo en su purificación, pero la única forma de saber si es que pertenecía o no a la bacteriocina L5 era a través de la medición directa de la actividad antimicrobiana de las muestras salidas de la columna. Esto no fue posible, debido tal vez a dos razones, la primera es que al pasar por la columna de separación, la bacteriocina se diluyó hasta una concentración tal que no era suficiente observar su actividad cuando era ensayada por la técnica de los pozos de agar; la segunda es que la bacteriocina sea tan sensible a la manipulación que su actividad se pierde al permanecer a temperatura ambiente por periodos de tiempo largos, incluso mayores de 70 min.

Los estudios continuaron con la bacteriocina parcialmente purificada. Se llevó a cabo la caracterización de la proteína a factores fisicoquímicos, probándose el pH y la temperatura donde su actividad es más eficiente.

Los ensayos realizados a la temperatura de 40 °C sirvieron para definir la máxima termorresistencia de la bacteriocina, la cual fue de 40 °C / 15 min. Para ello se tomó en cuenta que esta bacteriocina no era termorresistente, por lo cual era necesario pensar en temperaturas bajas, de refrigeración y congelación, donde demostró ser una buena candidata para utilizarse como bioconservador pues en condiciones de refrigeración (4°C) tiene un tiempo de vida media de 28 días, mientras que cuando se encuentra congelada su actividad inhibitoria permanece sin cambio hasta después de 72 días.

Con las condiciones de producción ya establecidas y el protocolo de purificación parcial bien delimitados, el siguiente paso consistió en observar cual era el efecto de esta bacteriocina sobre la cepa sensible 1. Al igual que durante los ensayos de mortalidad previos, durante este ensayo se observó que la bacteriocina L5 inhibía el crecimiento de la cepa 1. Incluso, como era de esperarse, la inhibición fue mayor, lo que significa que un grado de purificación mayor, aumentará la actividad de la bacteriocina probablemente sobre más cepas taxonómicamente relacionadas.

Los resultados encontrados a lo largo de este estudio nos permiten considerar a la bacteriocina L5 como un posible bioconservador en productos refrigerados, sin embargo se requiere de pruebas complementarias para conocer su estabilidad en diferentes productos.

Actualmente se está realizando un estudio en pescado para estudiar su aplicación (Guzmán, S. 1998)

## 9. CONCLUSIONES

- *Espectro de inhibición.*

La cepa de *Lactococcus lactis* 5 produce una bacteriocina a la que se le denominó bacteriocina L5, la cual inhibe el crecimiento de cepas taxonómicamente relacionadas, tal es el caso de *Lactococcus lactis* NRRL-B-2356, *Lactococcus lactis* NRLL-B-633 y *Lactococcus lactis subsp. cremoris* BM-B-149.

- *Optimización de la producción.*

Las condiciones óptimas de producción de la bacteriocina L5 son: medio CGB, temperatura 30 °C, atmósfera gaseosa de nitrógeno (100 mL/min), pH controlado a un valor de 5.5, agitación de 200 r.p.m. y la adición al medio de tween 80 al 1.0 %

- *Purificación parcial de la proteína.*

Durante la purificación parcial de la bacteriocina L5 se estableció que la proteína:

Es excretada por la célula productora al medio de cultivo

No es termorresistente ( 100 °C / 15 min)

Se precipita a concentraciones de sulfato de amonio de 60 %

Tiene un P.M. mayor de 8 KDa pero menor de 300 KDa

No se adsorbe a la membrana de la célula productora a pH 6.0

- *Caracterización tiempo / temperatura*

Su termorresistencia es hasta 40 °C /15 min a pH = 6.0

Resiste temperaturas de refrigeración ( 4°C) por 7 días a pH =6.0 sin perder actividad y hasta 28 días con una pérdida de actividad del 53 %

Resiste temperaturas de congelación (-20°C) por 72 días a pH= 6.0 sin perder actividad y hasta 98 días con una disminución en la actividad del 70 %

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

BIBLIOGRAFIA.

ABBOTT, D., R.S. Andrews. 1983. *Introducción a la cromatografía*. España. Ed. Alhambra. pp. 70-75

ALI, D. 1995. Characterization of diacetin B, a bacteriocin from *Lactococcus lactis* subs. *lactis* bv. *diacetylactis* UL720. *Can. J. Microbiol.* 41: 832-841

AUSUBEL F. & Brent Roger. 1993. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & sons, Inc. U.S.A. pp 2230-2235

BLOCK, S.S. 1991. Peroxigen compounds. En: *Disinfection, sterilization and preservation*. Ed. S.S. Block, Lea y Feabiger. Philadelphia pp. 169-180

BHUNIA, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. & Kalchayanad, N. 1991 Mode de action of pediocin Ach from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacterial strains. *J. Appl. Bacteriol.* 70:25-33

Catálogo de microorganismos, Instituto de Investigaciones Biomédicas. Colección de cultivos UNAM, 1988.

CAPPUCCINO, J. y Sherman, N. 1990. *Microbiology: a laboratory manual*. 3ª. Edición. Academic Press, U.S.A.

CROEGER, N. 1989. *Manual de microbiología Industrial*. 2a edición. Acribia. España, pp 82-124

DELLAGLIO, F. H. Roissart. M. Curk. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. Coordinateurs Roissart H. Edition Loriga. pp 25-47

ELV HARRIS and Angal, S. 1994. *Protein purification methods*. IRL Press. 1ª edición. U.S.A. pp. 47-129

ELLIKER, P.R. Anderson, A. & Hannensson, G. 1956. An agar culture medium for lactic acid streptococci and lactobacilli. *J. Dairy Sci* 39: 1611-1612

FOX, B. and A. Cameron. 1992. *Ciencia de los alimentos, nutrición y salud*. México, Ed. Limusa. pp. 369-401

GOULD, G. 1991. Antimicrobial compounds en: *Biotechnology and food ingredients*. Ed. Goldberg, I. R. Williams. VNRVAN Nostrand Reinhold. New York pp. 464-467

GUZMÁN, S. 1999. Empleo de la fermentación láctica en músculo fresco de cazón para aumentar el tiempo de anaquel. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 99pp

HOOVER, D. 1992. Bacteriocins: activities and applications. *Encyclopedia of Microbiology* vol 1. Academic Press. pp 181-190

HOOVER, D. and L. Steenson. 1993. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Academic Press. pp 1-6, 23-37, 41-48

HUOT, E., J. Meghrous, C. Barrena-González and H. Petitdemange. 1995. Bacteriocin J46, a new bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. cremoris* J46. *Letters in Applied Bacteriology*. 2(4): 307-311

JACK, R., J. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiological Reviews*. 59:2 pp 171-200

JAY, J. M. 1978. *Modern Food Microbiology*. New York, Van Nostrand Reinhold.

KLAENHAMMER, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*. 70:337-349

KLAENHAMMER, T.R. 1993 Genetics of bacteriocins produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology reviews*. 12:39-86

KNORR, D. A. Sinesky. (1985) Biotechnology in food production and proccessing. *Science*. 229: 1224-1229

Ley general de Salud. 1996 . Ed. Porrúa. México. pp. 280-281

MOAT, Albert. 1985. Biology of the lactic, acetic and propionic acid bacteria en: *Biology of industrial microorganisms*. Ed. Demain, A. N. Salomon. Butterworths. New York, pp 160-186

MEGHROUS, J., M. Huot, M. Quittelier and H. Petitdemange. (1992) Regulation of biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis subs. lactis*. *Res. Microbiol*. 143: 879-890

NETTLES, C.G. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *Journal of food protection*. 56:338-356

Pharmacia Laboratory Separation Division. Gel filtración theory and practice. pp 30-33

PIARD, J.C. Muriana, P. Desmazeaud M. & Klaenhammer T.R. 1992. Purification and partial characterization of Lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis subsp. lactis* CNRZ 481. *Appl. Environ. Microbiol*. 58:279-284

RONGGUANG, Yang. 1992. Novel Method to extract large amounts of bacteriocins from LAB. *Applied Environmental Microbiology*. 58(10): 3355-3359

SAHL, H-G- 1991. Pore-formation in bacterial membranes by cationic lantibiotics,. En: *Nisin and novel lantibiotics*. Ed. G. Jung and H-G Sahl. Escom. Publishers; Leiden, The Netherlands. pp. 347-358

SCHILLNER, U., F, Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Applied Environmental Microbiology*, (55) pp. 1901-1906

SCHLEIFER, KH. 1987. *FEMS Microbiology reviews*. 46:201-203

SHIRAI, K; I. Guerrero; P-Lara. 1996. Bacterias lácticas en alimentos fermentados. *Ciencia*. 47:125-137

SNEATH PHA, NS Mair y MS Sharp. 1986. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. vol 2. Baltimore

TAGG, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756

TOPLEY & Wilson. 1980. *Principles of bacteriology, virology & immunity*. Vol. 2 Systematic bacteriology. 8th edition. BC Decker. U.S.A.

VARIMO, K. & Londesborough, J. 1979. Evidence for essential arginine in yeast adenylate cyclase. *FEBS Lett.* 106:153-158

VOLK, W.; M. Wheeler. 1980. *Basic microbiology*. J.B. Lippincott Co. Toronto.. pp. 584-589

VOET, D. & J. Voet. Biochemistry. 1990. John Wiley & Sons. N.Y. pp 81-94

## ANEXO I

### ✧ Formulación de los medios y soluciones.

El medio de glicerol utilizado para conservar el stock a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  se prepara adicionando 30 uL de glicerol esteril a 70 uL de medio de cultivo (Elliker o CGB) que contenga a la cepa de interés en el inicio de la fase estacionaria. Esta mezcla se guarda en tubos eppendorf a la temperatura arriba indicada.

Por otra parte, el medio de leche es el ideal para conservar el stock a  $-20^{\circ}\text{C}$ , a continuación se describe su formulación.

Medio leche	gramos por litro
leche descremada	100
extracto de levadura	5
carbonato de calcio	10
glucosa	10
pH	7

Los medios empleados para el crecimiento de las 5 cepas lácticas usadas en esta investigación fueron los siguientes.

Medio Elliker	gramos por litro
triptona	20
extracto de levadura	5

NaCl	5
acetato de sodio	1.5
ácido ascórbico	0.5
sacarosa	5
lactosa	5
glucosa	5
agar	15
pH	6.8

Medio CGB	gramos por litro
triptona	20
glucosa	10
extracto de levadura	5
citrato de amonio	2
disodio fosfato	2
sulfato de magnesio	0.1
sulfato de manganeso	0.05
tween 80	1 ml
pH	7

Las soluciones empleadas para los diferentes ensayos fueron:

Solución salina fisiológica	g/L
Cloruro de sodio	8.5
Agua destilada	1 litro

Buffer de fosfatos 25 mM (Buffer Sorensen)	Un litro
Fosfato monobásico de sodio	3.42 en 877 ml de agua destilada
Fosfato dibásico de sodio	1.1 en 123 ml de agua destilada
Ácido fosfórico concentrado	2 % (pH = 6)

ANEXO II.

☆ Especificaciones del equipo.

EQUIPO	ESPECIFICACIONES.
Espectrofotómetro.	Spectronic instruments 21D
Centrífuga.	DuPont Instruments RC-5 superspeed refrigerated centrifuge
Incubadora	Control enviromental incubator New Brunswick Scientific
Balanza analítica	Ohaus E400
pHmetro	Beckman model 3500 digital
Fermentador	4 L New Brunswick Scientific
Liofilizadora	Freeze dryer 5 Labconco
Equipo de Cromatografía líquida de alta resolución. (HPLC)	Waters 600S Controller Millipore Waters 626 pump Millipore Waters 994 programmable photodiode array detector Columna de filtración en gel de 60-300 SW

ANEXO III

Tabla de porcentajes de sulfato de amonio para precipitación por saldo.

		Final concentration of ammonium sulphate—% saturation at 0°C																
		20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
		g solid ammonium sulphate to add to 100 ml of solution																
Initial concentration of ammonium sulphate, % saturation	0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.3	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
	5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
	10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
	15	2.6	5.4	8.2	11.1	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
	20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
	25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
	30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
	35				0	2.8	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.4	29.1	32.9	36.9	41.0	45.3
	40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	25.8	29.6	33.5	37.6	41.8
	45						0	2.9	5.9	9.0	12.3	15.6	19.0	22.6	26.3	30.2	34.2	38.3
	50							0	3.0	6.0	9.2	12.5	15.9	19.4	23.0	26.8	30.8	34.8
	55								0	3.0	6.1	9.3	12.7	16.1	19.7	23.5	27.3	31.3
	60									0	3.1	6.2	9.5	12.9	16.4	20.1	23.9	27.9
	65										0	3.1	6.3	9.7	13.2	16.8	20.5	24.4
	70											0	3.2	6.5	9.9	13.4	17.1	20.9
	75												0	3.2	6.6	10.1	13.7	17.4
	80													0	3.3	6.7	10.3	13.9
85														0	3.4	6.8	10.5	
90															0	3.4	7.0	
95																0	3.5	
100																		0

Tomado de ELV Harris, 1994

## ANEXO IV.

### Preparación y almacenaje de membranas de diálisis

#### Soluciones

NaHCO <sub>3</sub>	10mM
Na <sub>2</sub> EDTA	10mM
Etanol	20- 50%

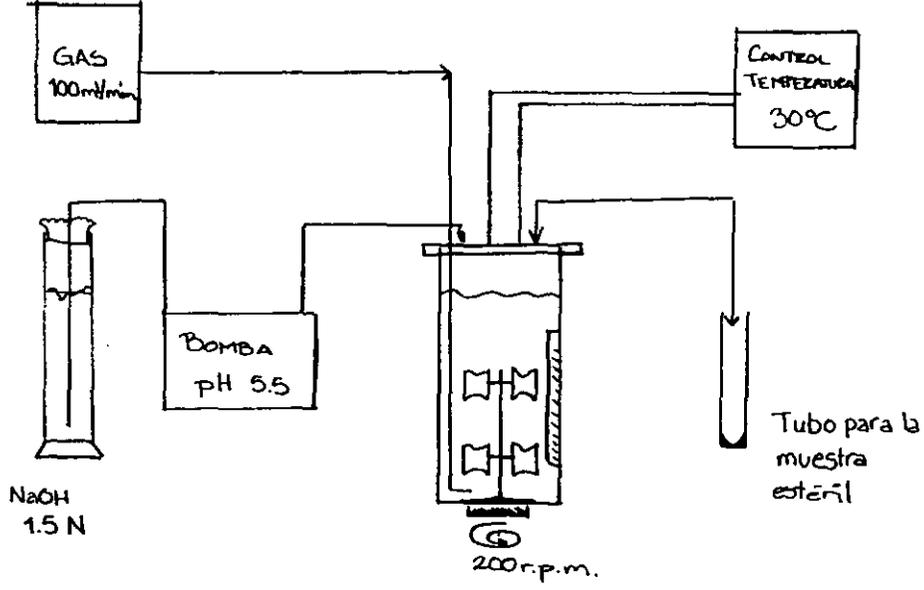
1. Remover el tubo de membrana del rollo y cortar en tamaños necesarios (15-20 cm) con guantes para evitar contaminaciones por microorganismos.
2. Hervir por varios minutos en solución NaHCO<sub>3</sub> 10mM
3. Hervir por varios minutos en Na<sub>2</sub>EDTA 10mM. Repetir el proceso de hervir acelera el tratamiento
4. Lavar varias veces con agua destilada
5. Almacenar a 4°C en etanol 20-50% para evitar el crecimiento de microorganismos celulolíticos.

#### • USO DE LAS MEMBRANAS DE DIÁLISIS

1. Se toma un tubo de membrana de diálisis del etanol y se enjuaga con agua destilada y se coloca una pinza a uno de los extremos
2. Se lava la membrana con agua destilada, se toma el extremo sin pinza y se tapa, se oprime para verificar la presencia de agujeros o fugas.
3. Se reemplaza el agua de la membrana con la solución a dializar y se coloca la otra pinza
4. Se sumerge el tubo de diálisis en un vaso de precipitado con 4 lt de tampón fosfatos 25mM a pH 6 y dializar con agitación lenta a 4°C

ANEXO V

Esquema del fermentador New Brunswick de 4 L



## ANEXO VI.

### CÁLCULO DEL PESO MOLECULAR APARENTE.

El peso molecular aparente es calculado a partir de estándares de proteínas procesados en un equipo de HPLC waters modelo 626 LC acoplado a un detector UV-VIS de arreglo de diodos modelo 996, integrados a un software Millennium 2010. Se utilizó una columna de filtración en gel de 300 SW (8.0 X 300 mm). Las condiciones bajo las cuales se analizaron los estándares fueron las mismas bajo las cuales se analizaron las muestras problema.

Los estándares utilizados fueron:

ESTÁNDARES	PESO MOLECULAR (Da).
Albúmina sérica bovina	67 000
Ovoalbúmina	43 000
Quimotripsinógeno	25 000
Ribonucleasa A	13 700

Tomando en cuenta las siguientes condiciones se calculó el  $K_{av}$  de cada estandar.

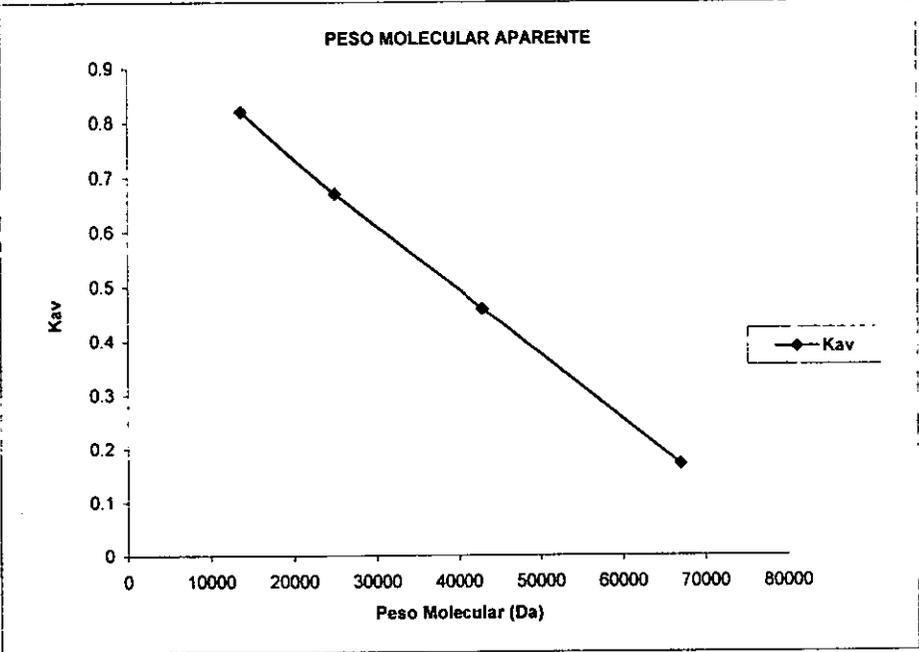
Volumen inicial ;  $V_o = 5.669$  ml

Volumen total;  $V_t = X$  ml

Volumen de elución;  $V_e =$  velocidad de flujo (ml)  $\times$  tiempo de retención

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Con estos datos se construyó una gráfica de pesos moleculares aparentes.



Los pesos moleculares aparentes de las muestras que contenían la bacteriocina se calcularon con la ecuación de la recta.