



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

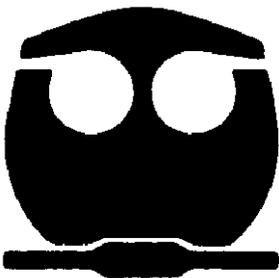
**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERICIDA
DE PÉPTIDOS PRODUCIDOS POR
BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE
UN QUESO TRADICIONAL MEXICANO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ANNEL MAGDALENA HERNÁNDEZ ALCÁNTARA



MÉXICO D.F.

2010



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.

Agradecimientos

Primeramente le doy gracias a Dios por brindarme la dicha de vivir, agraciarme con sus bendiciones y amor, por ser una guía en mi vida y permitirme llegar hasta aquí.

Agradezco infinitamente el apoyo de mis padres, César J. Hernández y Esthela Alcántara, sin el cual no hubiera podido realizarse este logro. Gracias por el esfuerzo que han hecho para permitirme culminar mis estudios, todas sus enseñanzas y consejos, los desvelos que soportaron conmigo; así como los triunfos y caídas ante las cuales siempre estuvieron ahí para hacerme ver que contaría con su apoyo en la toma de las decisiones que más convinieran a mi superación.

Gracias también a mi hermana Jazmín, por su enorme apoyo, y que al igual que mis

padres, me ha brindado parte de su tiempo para escuchar y buscar juntas alguna solución ante los pequeños tropiezos en mi camino, por la confianza que ha depositado en mi persona y por todos esos bellos momentos que hemos pasado juntas.

A mi abuelita, tíos y amigos miembros de mi familia, por estar en todo momento pendientes de mi crecimiento, por alentarme siempre a seguir adelante para superarme y por todo su amor y apoyo. También a las personas que aunque ya no están presentes, siempre seguirán dejando huella donde quiera que se encuentren.

Te agradezco Alan, por todo el apoyo que me has brindado desde que iniciamos este camino juntos, por tu paciencia y comprensión en todo momento, porque juntos hemos trabajado

para alcanzar este logro en nuestras vidas, por el ánimo que me contagiaste en los días difíciles y por traer felicidad a mis días.

Agradezco a mi asesora, la Dra. Maricarmen Quirasco Baruch, por la oportunidad brindada para contribuir en este proyecto y por la guía a través de sus conocimientos que me permitieron realizar el mismo.

De igual forma agradezco al Q. A. Israel García por su labor para asesorarme y apoyarme en la elaboración de este proyecto.

Agradezco a las doctoras Amelia Farrés y Gloria Díaz, por sus valiosos consejos y aportaciones para mejorar este trabajo.

Gracias a mis profesores de la carrera por todas las enseñanzas que me han proporcionado las herramientas necesarias para llegar hasta aquí.

Al ceparío de la Facultad de Química, que fue uno de los lugares donde adquirí muchos de los conocimientos que facilitaron mi labor durante este proyecto. En especial gracias a los profesores Alejandro Camacho, Martha Giles, María Antonieta Silva y a la laboratorista Laura Ramírez por todas sus enseñanzas y consejos.

A los laboratoristas del Laboratorio 312, porque sin su labor no tendríamos el material para trabajar oportunamente.

A mi gloriosa Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios, por darme la oportunidad de formar parte de su comunidad estudiantil, hacer uso de sus instalaciones y proporcionarme una educación de excelencia para emprender un nuevo camino como profesionista.

A todos por siempre GRACIAS.

INDICE

RESUMEN.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	6
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. GENERALIDADES SOBRE LA MANUFACTURA DE LOS QUESOS.....	8
2.2. QUESO COTIJA.....	9
2.2.1. Generalidades.....	9
2.2.2. Proceso de Elaboración.....	11
2.3. GENERALIDADES SOBRE LAS BAL Y SUS PRODUCTOS METABÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	15
2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS GÉNEROS DE BAL AISLADAS DEL QUESO COTIJA.....	18
2.4.1. Género <i>Lactobacillus</i>	18
2.4.2. Género <i>Enterococcus</i>	19
2.5. PAPEL DE LAS BAL EN LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS.....	21
2.5.1. Definición y producción de bacteriocinas.....	21
2.5.2. Clasificación.....	22
2.5.3. Aplicaciones.....	23
2.6. BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS....	25
2.6.1. Propiedades físicas y químicas de las bacteriocinas.....	26
2.6.2. Heterogeneidad en el tamaño de las bacteriocinas.....	27
2.6.3. Algunas bacteriocinas producidas por los géneros de BAL aisladas del queso Cotija.....	27
2.7. DETECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS.....	31

2.7.1. Métodos Indirectos.....	31
2.7.2. Métodos Directos.....	32
2.7.3. Puntos importantes en la detección de cepas productoras de bacteriocinas.....	33
2.8. PURIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.....	33
3. HIPÓTESIS.....	36
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. Objetivos generales.....	36
5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	37
5.1. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS.....	36
5.1.1. Cepas de Identidad Conocida.....	38
5.2. ESPECTRO DE SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA.....	39
5.2.1. Reactivación de cepas de BAL.....	39
5.2.2. Cultivo en Matraz.....	40
5.2.3. Obtención de los sobrenadantes.....	41
5.2.4. Concentración de los sobrenadantes.....	41
5.2.5. Determinación de proteína.....	41
5.2.6. Pruebas presuntivas por difusión en agar.....	42
5.3. OBTENCIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS EN LA FASE ÓPTIMA DE CRECIMIENTO.....	44
5.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA	
5.4.1. Selección de las cepas con mayor actividad.....	45

5.4.2. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas BAL del queso Cotija.....	46
5.4.3. Efecto de la Fuerza Iónica ([NaCl]) sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas de BAL del queso Cotija.....	48
5.4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de cepas de BAL del queso Cotija.....	50
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1. CESPED BACTERIANO.....	52
6.2. PRUEBAS PRESUNTIVAS POR DIFUSION EN AGAR.....	52
6.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA	
6.3.1. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas de BAL del queso Cotija.....	65
6.3.2. Efecto de la Fuerza Iónica ([NaCl]) sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas de BAL del queso Cotija.....	75
6.3.3. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas de BAL del queso Cotija.....	84
7. CONCLUSIONES.....	103
8. PERSPECTIVAS.....	107
9. ANEXO I.....	108
10. ANEXO II.....	133
11. BIBLIOGRAFÍA.....	166

RESUMEN

El Queso Cotija es un producto lácteo fermentado, madurado, de pasta dura, con alta concentración de sal (6%), desmoronable y de sabor fuerte. Es elaborado de forma artesanal desde hace más de 400 años en la Sierra limítrofe entre Jalisco y Michoacán, con leche entera, cruda de vaca. Cabe destacar que en ninguna etapa de su proceso se aplica algún tratamiento térmico, así como la inoculación intencional de cultivos iniciadores.

En trabajos previos se logró aislar e identificar, mediante técnicas moleculares y bioquímicas a microorganismos pertenecientes a las bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Bravo, 2008; Zuñiga, 2009). Así mismo, se demostró que durante el proceso de maduración del producto, la cuenta inicial de microorganismos coliformes (400 UFC/g) disminuye drásticamente en los primeros 40-60 días (Bravo, 2008). Dicho efecto se debe a la disminución del a_w y al aumento de acidez del producto. Aunado a estos factores fisicoquímicos, la disminución de la carga microbiana se puede atribuir también a la producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas presentes en el queso Cotija.

En el presente trabajo se identificó la fase óptima de producción de compuestos antibacterianos de las BAL aisladas del queso Cotija, mediante la realización de un espectro de susceptibilidad frente a microorganismos de importancia en salud, indicadores y relacionados filogenéticamente. Además se logró caracterizar el extracto crudo de las BAL en función del pH, temperatura y fuerza iónica ($[NaCl]$) con la finalidad de identificar las condiciones más apropiadas que les permitan ejercer una mayor actividad antagonista frente *E. coli* y *S. aureus* y contribuir de esta manera con la inocuidad del queso Cotija.

Se observó que durante la fase estacionara temprana de crecimiento se presentó la mayor actividad antibacteriana por parte de los compuestos producidos por las BAL del

queso Cotija. Dichos compuestos antibacterianos, presentaron las siguientes características:

- Capacidad de actuar bajo un amplio rango de pH (5.0 - 8.0).
- Estabilidad térmica frente a las diversas temperaturas ensayas en un intervalo de 4°C a 120°C durante períodos de 20 min; así como también por 60 min a una temperatura de 100°C, siendo esta condición la que mayor actividad antibacteriana presentó.
- La actividad antibacteriana no se vio afectada por la presencia de altas concentraciones de sal.

Por los resultados anteriores, se estableció que algunos de los compuestos extracelulares producidos por las BAL aisladas del queso Cotija contribuyen con la inocuidad del producto durante la etapa de maduración al que es sometido, debido a la capacidad que éstos presentaron para ejercer la actividad antagonista frente a los microorganismos de importancia en salud usados como indicadores.

1. INTRODUCCION

El queso Cotija es un producto lácteo fermentado, madurado, de pasta dura y prensada, con alta concentración de sal (6%), desmoronable y de sabor fuerte, elaborado en piezas de gran tamaño que llegan a pesar hasta 22 kg en promedio. Se habla de un queso auténtico cuando las materias primas, el proceso de elaboración y, en este caso, el de maduración se lleva a cabo en su sitio de producción, esto es durante tres a cuatro meses; periodo durante el cual tienen lugar todos los procesos bioquímicos por parte de la microbiota presente en el queso, las cuales le confieren características tales como aroma, olor y sabor particular que lo diferencian de otro tipo de quesos (Cervantes *et al.*, 2008). El proceso de elaboración se realiza de forma artesanal desde hace más de 400 años en la Sierra limítrofe entre Jalisco y Michoacán (Jalmich), con leche entera, cruda de vaca (entiéndase por leche cruda, aquella que no ha recibido algún tratamiento mediante el cual disminuya la carga bacteriana), cabe destacar, que durante el proceso de elaboración del queso no se aplica algún tratamiento térmico, así como tampoco se realiza la inoculación intencional de cultivos iniciadores (Bravo, 2008).

En el grupo de trabajo se ha demostrado que durante el proceso de maduración del producto, la cuenta de microorganismos coliformes inicial (400 UFC/g) disminuye drásticamente a $< 3\text{UFC/g}$, en los primeros 40-60 días (Bravo, 2008). Esto se puede deber a la disminución del a_w , al aumento de acidez y a la producción de sustancias capaces de inhibir el crecimiento de microorganismos coliformes. Del queso Cotija se han aislado microorganismos de los géneros *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*) y *Lactobacillus* (*L. pentosus*, *L. brevis* y *L. paracasei*), que pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL) (Bravo, 2008; Zuñiga, 2009) y que son capaces de producir sustancias antibacterianas.

Numerosos estudios han revelado que las BAL utilizadas en la manufactura de los quesos convierten la lactosa en ácido láctico y además producen metabolitos que pueden influir en la composición de la microbiota del queso e inhibir el desarrollo de

bacterias patógenas causantes de la descomposición del alimento (Cotter *et al.*, 2005).

La variedad de especies bacterianas que producen este tipo de compuestos antibacterianos ha ocasionado un gran interés en su investigación, debido a las características antagónicas que han presentado contra diversos microorganismos patógenos presentes en los alimentos y ante una mayor demanda por parte de los consumidores para la producción de alimentos menos procesados. El uso de las BAL y sus productos metabólicos o ambos, se han utilizado para mejorar la seguridad y calidad de los alimentos que no son sometidos a un proceso de fermentación (Bravo, 2008).

Entre los metabolitos ampliamente estudiados y secretados por las BAL están las bacteriocinas, compuestos estables a pH ácido y neutro adaptados al ambiente generado por este grupo de microorganismos (Ponce *et al.*, 2007; Topisirovic *et al.*, 1995).

Dado que las BAL son generalmente reconocidas como seguras (GRAS) por la FDA, ellas o sus bacteriocinas pueden ser empleadas de manera segura durante la producción de alimentos y la preservación de éstos. Sin embargo, la única bacteriocina que ha sido autorizada por este organismo para ser empleada en los alimentos es la nisina®.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES SOBRE LA MANUFACTURA DE LOS QUESOS

La manufactura de algunos quesos involucra la combinación de cuatro ingredientes: leche, cuajo o renina, microorganismos y sal, los cuales son procesados a través de una serie de pasos comunes como son la formación del gel o cuajada, la expulsión del suero, la producción de ácido y la incorporación de sal, seguidos de un período de maduración (Beresford *et al.*, 2004).

El objetivo primario en la manufactura de queso está encaminado a extender el tiempo de vida de anaquel y conservación de los componentes nutritivos de la leche a través de la producción de ácido y/o deshidratación. La producción de ácido por la microbiota inicial durante la manufactura de los quesos conlleva a una disminución en el pH de la leche y este proceso, en combinación con la agitación y cocimiento (si lo hay), promueven la sinéresis del cuajo y la expulsión del suero. Variaciones en los parámetros de procesamiento, como la temperatura de cocción y el manejo que se le da al cuajo obtenido, determinarán las características de cada tipo de queso, que en conjunto con la microbiota presente de forma nativa o inoculada intencionalmente, tendrá un papel crítico e importante en el desarrollo de las características únicas de cada variedad de queso (Beresford *et al.*, 2004).

Los quesos sometidos a un proceso de maduración presentan una serie de reacciones bioquímicas y la microbiota que se manifiesta durante éste puede dividirse en dos categorías:

- Iniciadores: Bacterias Ácido Lácticas (BAL) que están involucradas en la producción de ácido durante la manufactura de los quesos y que además contribuyen al proceso de maduración.
- Microorganismos secundarios: no contribuyen de manera importante con la producción de ácido durante la manufactura de los quesos, pero generalmente tienen un papel importante durante la maduración. Esta microbiota secundaria

está integrada por Bacterias Ácido Lácticas No Iniciadoras (BALNI) que crecen en el interior de muchas variedades de quesos. Existen otros microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que crecen tanto en el interior como en el exterior y se emplean con la única finalidad de especificar una variedad de queso de otras muy relacionadas (Beresford *et al.*, 2004).

2.2 QUESO COTIJA

2.2.1 Generalidades

El queso Cotija es elaborado por un pequeño grupo de productores de la región de Cotija, donde convergen los estados de Jalisco y Michoacán (Sierra de Jalmich), destacan principalmente los municipios de Santa María del Oro, Jalisco, el sur de Tocumbo y de Cotija, Michoacán. La producción se extiende hacia municipios aledaños a los anteriormente mencionados: norte de Jilotlán de los Dolores, oriente de Tamazula, sur del Valle de Buena Vista Tomatlán, Michoacán (*Figura 1*) (Cervantes *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2005).

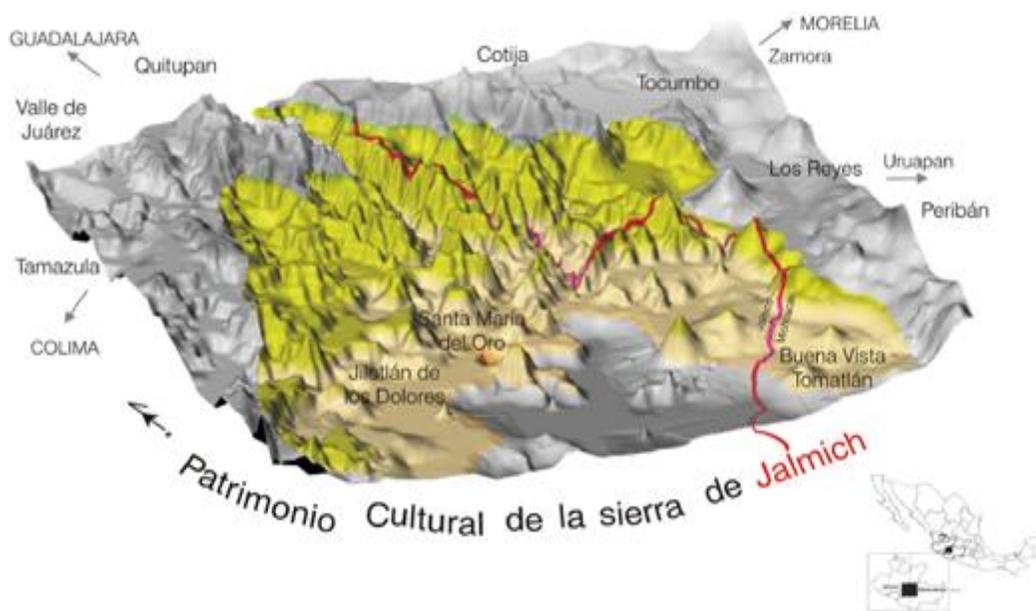


Figura 1. Sierra de Jalmich, región productora del queso Cotija (Álvarez *et al.*, 2005)

El 7 de marzo del 2005 el Instituto Mexicano de la Propiedad industrial (IMPI) concedió a la Asociación Regional de Productores de Queso Cotija, la Marca colectiva del “Queso Cotija Región de Origen.”

De acuerdo con la Ley de Fomento y protección de la Propiedad Industrial, la Marca Colectiva (MC) se define como “*aquel signo visible que distingue en el mercado los productos y servicios de las asociaciones, sociedades de productores, fabricantes, comerciantes o prestadores de servicios, legalmente constituidas, respecto de los productos o servicios de terceros*” (Pomeón, 2007).

El signo que representa la Marca Colectiva obtenido se puede visualizar en la etiqueta (*Figura 2*); así como también en la apariencia del producto que es de presentación cilíndrica, formato grande (aproximadamente de 20 kg) y con corteza “marmoteada” como consecuencia de las marcas del ixtle con la que fue envuelto al moldear (*Figura 3*). La Marca Colectiva constituye una protección oficial y al mismo tiempo una ventaja competitiva del producto en el mercado, proporcionando una garantía de autenticidad y calidad a los consumidores, así como un precio más justo para los productores (Álvarez *et al.*, 2005).



Figura 2. Etiqueta Marca Colectiva Región de Origen (Álvarez *et al.*, 2005)

El queso Cotija es un queso estacional, es decir, de producción limitada, pues sólo se elabora de julio a octubre en época de lluvias. Puede encontrarse en el mercado a partir del mes de diciembre (Álvarez *et al.*, 2005).

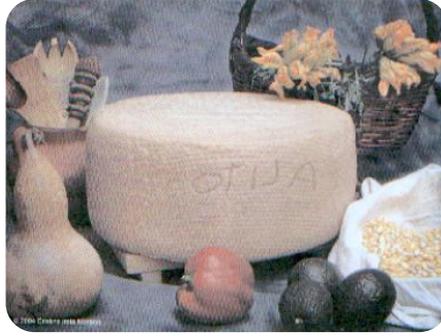


Figura 3. Queso Cotija autentico (Álvarez *et al.*, 2005)

2.2.2 Proceso de elaboración (Cervantes *et al.*, 2008; Álvarez *et al.*, 2005)

De acuerdo a las Reglas de Uso, el queso Cotija deberá elaborarse a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos a la leche u otros ingredientes que no correspondan con la sal y cuajo.

2.2.2.1 Obtención de la leche

La ordeña se realiza a temprana hora del día manualmente y proviene de ganado criollo o híbrido, alimentado por libre pastoreo, exclusivamente en praderas naturales o inducidas que se encuentren localizadas en la región que protege la marca. Toda la leche utilizada debe ser fresca y provenir de las vacas ordeñadas durante la época de lluvia (junio a octubre).

2.2.2.2 Manejo y traslado de la leche

Una vez realizada la ordeña, la leche se recolecta en cubetas y vertida en contenedores para transportarla al rancho donde se elabora el queso.

La leche sufre un reposo que permite el descenso de la temperatura de aproximadamente 37°C hasta 30-33°C. Posteriormente se adiciona el cuajo animal diluido (aproximadamente 10 mL por cada 100 L de leche), empleando utensilios de

cocina limpios (cuchara o pala de madera) para agitar y posteriormente dejar reposar hasta que la cuajada adquiera la consistencia para proceder al corte.

2.2.2.3 Corte de la cuajada y separación del suero

Cuando la consistencia de la cuajada es firme a la vista y al tacto, se inicia el corte con una pala o cuchara de madera, efectuando una cruz que permita observar la claridad del suero y firmeza de la cuajada y, si resulta necesario, dejar reposar más tiempo a la misma.

Después del corte, se reposa durante una hora, empujando la cuajada hacia un lado de la tina para que sea más fácil su recolección con un colador y permita su traspaso a la artesa, donde nuevamente se deja reposar hasta que adquiera consistencia y se puedan unir los pedazos colocados. Se pueden manejar bloques de cuajada, apilarlos y reacomodarlos para permitir la salida de una mayor cantidad de suero, efectuando cortes entre cada bloque apilado y esperando el escurrimiento del suero para volver a apilar un bloque.

2.2.2.4 Amasado y salado

Se adiciona una cantidad de sal cruda de mar proporcional a la leche que se empleó ese día (5% al 10%), y considerando el grado de salado que se le desee dar a la pieza de queso. Se realiza a mano, distribuyendo homogéneamente la sal en la cuajada, teniendo cuidado de no perder sólidos junto con el suero debido a la excesiva manipulación o al calor generado, lo que afecta su consistencia y le proporciona una textura demasiado elástica que es indeseable.

2.2.2.5 Moldeado y prensado

Se coloca la cuajada dentro del molde en forma de aro o una faja elaborada con corteza de árbol y dos mantas de ixtle que envuelven la pasta. Se prensa la pasta de queso

durante un tiempo que va de 18 a 24 horas con ayuda de piedras. Transcurrido el mismo, se retiran y desfaja la pasta ajustando nuevamente al diámetro obtenido después del prensado. Este proceso se efectúa diariamente junto con la limpieza de la superficie del queso por 8-12 días, siendo colocadas de forma invertida sobre el anaquel (zarzo) hasta lograr una firmeza en la pieza y sin escurrimiento de ningún líquido.

2.2.2.6 Maduración del queso

Se lleva a cabo dentro de la quesería con una humedad relativa del 80% y temperatura de 20-25°C. El queso *Cotija Región de Origen* deberá tener un mínimo de tres meses de vida dentro del área geográfica que protege la marca, considerando el inicio de su vida a partir del retiro de la prensa. Con base en su tiempo de añejamiento o maduración la clasificación es la siguiente:

- a) Añejo; cuando el queso tenga de entre tres a seis meses de vida.
- b) Rendido; cuando un queso tenga más de seis meses de vida.

2.2.2.7 Venta y distribución

Finalizado el tiempo mínimo de maduración (3 meses), el producto se encuentra listo para su consumo; autoconsumo o venta en tiendas locales, ferias, mercados, etc. Se almacena sin necesidad de refrigeración (*Figura 4*).



Figura 4. Queso Cotija Región de Origen listo para la venta (Álvarez *et al.*, 2005)

En la *Tabla 1* se resumen las especificaciones fisicoquímicas que debe cumplir un queso Cotija auténtico madurado. Algunos de los parámetros ya han quedado establecidos en el Anteproyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009 SISTEMA PRODUCTO LECHE- ALIMENTOS- LÁCTEOS- ALIMENTO LÁCTEO REGIONAL- QUESO COTIJA ARTESANAL MADURADO- DENOMINACIÓN, ESPECIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.

El resto de las especificaciones ha sido determinado por Hernández, V. (2007) al analizar ocho muestras diferentes dentro de la zona productora de queso Cotija.

Tabla 1. Especificaciones fisicoquímicas de un Queso Cotija madurado		
Grasa butírica	23% mínimo *	24.8%
Proteína	25% mínimo *	27.9%
Carbohidratos		0.1%
Cenizas		6.7%
NaCl		3.4%
Humedad	36% máximo *	37.1%
pH		4.8-5.2
% Ácido Láctico		0.2-0.32%
a_w		0.79-0.9

* Especificaciones establecidas en el Anteproyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009.

2.3 GENERALIDADES SOBRE LAS BAL Y SUS PRODUCTOS METABÓLICOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La gran mayoría de las Bacterias Ácido Lácticas son consideradas microorganismos GRAS (sin embargo, se requieren pruebas que corroboren su seguridad alimentaria), de morfología variada ya que pueden ser cocos o bacilos, Gram positivos, no móviles ni esporulados, no formadores de pigmentos, catalasa, reductasa y oxidasa negativos; así mismo no cuentan con la capacidad de reducir los nitratos. Filogenéticamente son miembros de la subdivisión *Clostridium- Bacillus* de las *Eubacterias* Gram positivas.

Se encuentran en cantidades importantes tanto en el ambiente, la piel y en el aparato digestivo. Presentan un metabolismo variado, con base en el que se pueden clasificar en (De Vuyst & Vandamme, 1994b):

- Homofermentativas (homolácticas): el metabolismo que caracteriza a este grupo es la ruta de Embden- Meyerhof (Vía Glucólisis) de la cual se obtiene como producto principal ácido láctico.
- Heterofermentativas (heterolácticas): las bacterias dentro de este grupo emplean la Vía 6-Fosfogluconato/Fosfocetolasa (Pentosa Fosfato), generando pequeñas cantidades de etanol, ácido acético y CO₂, además de ácido láctico.

Su crecimiento y actividad se ven afectadas por condiciones selectivas de potencial electroquímico (E_h), a_w , pH, temperatura y altas concentraciones de sal. Esto último es importante pues las cepas de BAL halófilas no son comunes. Los parámetros fisicoquímicos anteriormente mencionados retardan el crecimiento y actividad de muchos otros microorganismos que alteran los alimentos de manera que, aunado a la presencia de las BAL, influyen directamente en la vida de anaquel e inocuidad del producto en cuestión.

Diversos estudios han establecido que la actividad de las BAL puede limitar o inhibir el crecimiento de otras bacterias patógenas por la producción de ciertas sustancias inhibitorias como (Wordpress, 2008; Wood, 1992):

-
-
- Ácidos orgánicos:
 - Láctico: producto principal resultante del metabolismo fermentativo, responsable de la disminución del pH en el medio y por tanto con efecto antagonista sobre microorganismos no ácido-tolerantes. La forma no disociada del ácido ($pK_a=3.08$) ejerce un efecto antibacteriano al colapsar el gradiente electroquímico de protones en la membrana, causando con ello la muerte de las bacterias más susceptibles.

 - Acético y Propiónico: la síntesis de ambos depende de las condiciones bajo las cuales se lleve a cabo el crecimiento microbiano. De la misma manera que el ácido láctico, ambos interaccionan con la membrana celular de otros grupos microbianos al neutralizar el potencial electroquímico. Poseen valores de pK_a más altos que el láctico a un mismo valor de pH (4.75 y 4.87 respectivamente), lo cual les permite tener un mayor efecto antibacteriano.

 - Peróxido de hidrógeno (H_2O_2): una gran cantidad de BAL lo generan durante su metabolismo, los niveles de H_2O_2 pueden llegar a auto-inhibir cultivos de lactobacilos y lactococos. En los medios sólidos donde las células lácticas están más próximas se pueden llegar a generar radicales hidroxilo (OH^\cdot) además de superóxido ($O_2^\cdot^-$), ambos son potentes sistemas antibacterianos. Sin embargo, la capacidad de este compuesto para la conservación de alimentos es limitada dado que existen muchos factores que pueden inhibir su efecto. Entre ellos, la reacción con el O_2 presente, la presencia de diferentes niveles de superóxido dismutasa y catalasa, además de la oxidación natural de este compuesto y los radicales libres formados que alteran la calidad sensorial de los alimentos.

 - Ácidos grasos antibacterianos: generados como consecuencia de la actividad lipolítica principalmente por bacilos y lactobacilos, son de cadenas media y larga (12-16 carbonos) con actividad similar a la de los detergentes. Por otra parte, esta
-
-

propiedad metabólica es empleada en la elaboración de productos lácteos fermentados a los que les proporcionan aroma y sabor.

Adicionalmente, existe una amplia gama de sustancias producidas por las bacterias ácido lácticas que también presentan actividad antibacteriana las cuales se enlistan en la *Tabla 2*.

Tabla 2. Metabolitos con actividad antibacteriana producidos por las BAL		
Metabolito	Microorganismo productor	Referencia
Diacetilo	BAL	Montville y Winkowski 1997
Reuterina	<i>L. reuteri</i> <i>L. coryniformis</i>	Magnusson, J. <i>et al.</i> , 2003
BLIS: Sustancias inhibitorias similares a las bacteriocinas	BAL	Montville y Winkowski 1997
Bacteriocinas	BAL	Nes, <i>et al.</i> , 1996;
Dipéptidos cíclicos: ciclo-PhePro ciclo-PheOHPro ciclo-GlyLeu	<i>L. coryniformis</i> <i>L. plantarum</i> <i>P. pentosaceus</i>	Magnusson y Schnürer 2001 Ström <i>et al.</i> , 2002
Hidroxiácidos 3-hidroxi-tetradecanoico 3-hidroxi-decanoico 3-hidroxi-5-cis-dodecanoico 3-hidroxidecanoico	<i>L. plantarum</i> MiLab 14	Magnusson, J. <i>et al.</i> , 2003
Actividad proteolítica	BAL	Visser, S. <i>et al.</i> , 1986.

2.4. CARACTERÍSTICAS DE LOS GÉNERO DE BAL AISLADAS DEL QUESO COTIJA

Los géneros representativos de las BAL se pueden agrupar con base en su morfología (De Vuyst & Vandamme, 1994b; Franz *et al.*, 1999; Monroy *et al.*, 2009):

- Cocos: caracterizado por los géneros *Aerococcus*, *Alloiococcus*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus* y *Vagococcus*.
- Bacilos: representado por los géneros *Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactosphaera*, *Marinilactibacillus*, *Paralactobacillus* y *Weisella*

Del queso Cotija se han logrado aislar microorganismos pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* cuyas características más destacadas se presentan a continuación.

2.4.1 Género *Lactobacillus* (Bernardeu *et al.*, 2006 ; Wood *et al.*, 1995)

Este género se encuentra ampliamente distribuido en vegetales, carnes, pescado, forman parte de la microbiota normal de la boca y tracto intestinal de humanos y animales. La mayoría no son considerados patógenos. Este se ha dividido en tres subgrupos:

- ✦ Homofermentativos obligados: degradan las hexosas exclusivamente a ácido láctico siguiendo la ruta Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) y no fermentan las pentosas o el gluconato, pues carecen de las enzimas necesarias para ello.
- ✦ Heterofermentativos facultativos: fermentan las hexosas a ácido láctico y pueden producir CO₂ a partir del gluconato pero no de la glucosa. También fermentan las pentosas para producir ácido láctico y acético.

-
-
- ✦ Heterofermentativos obligados: degradan las hexosas a ácido láctico, ácido acético, etanol y CO₂, y las pentosas a ácido láctico y ácido acético.

Algunas cepas de *Lactobacillus* presentan la capacidad de producir bacteriocinas, motivo por el cual han sido empleadas como conservadores en alimentos fermentados, principalmente los lácteos.

Su desarrollo se ve favorecido por la anaerobiosis, crecen en un intervalo de temperatura que comprende de 2°C-53°C, aunque su temperatura óptima es de 30-40°C. Son acidúricos, creciendo óptimamente a pH comprendidos entre 5.5-6.2.

2.4.2 Género *Enterococcus*

Forman parte de la microbiota intestinal natural presente en los humanos y animales, y ejercen un papel muy importante para mantenerla en equilibrio (De Kwaadsteniet *et al.*, 2004). Además, al formar parte del grupo de la BAL se emplean con frecuencia en la fermentación de alimentos y su actividad principal es promover la estabilidad bacteriana del producto fermentado final. Las especies de este grupo tienen la capacidad de crecer en presencia de un 6.5% de NaCl, 40% de sales biliares, un intervalo de pH de 4.0-9.6 y resistencia térmica por 30 min a 60°C; por otra parte el rango de temperaturas para su desarrollo comprende de los 10°C-45°C, siendo el óptimo de 30-37°C.

Se han aislado a partir de alimentos, plantas, agua y suelo, probablemente como resultado de la diseminación de las fuentes de desecho animal y la tolerancia que presentan ante diversas condiciones ambientales. A diferencia de las otras BAL, este grupo no es generalmente reconocido como seguro (GRAS), y su detección en el agua es indicativo de contaminación fecal (Ogier *et al.*, 2008)

En lo que corresponde a su aplicación la situación es bastante compleja. Por una parte en la industria quesera, su empleo como cultivo iniciador en conjunto con otro microorganismo tiene un efecto positivo (Giraffa, 2003); mientras que suelen ser

considerados como patógenos para los seres humanos bajo otras circunstancias (Moellering, 1992).

La presencia de *Enterococos* como parte natural de la microbiota en algunos alimentos elaborados de manera artesanal ha ocasionado mucho debate dado que hay algunas evidencias que los relacionan con infecciones clínicas presentadas en pacientes con el sistema inmunológico comprometido o aquellos que se encuentran recuperándose de una cirugía, principalmente las especies *E. faecalis* y *E. faecium* (Boyce *et al.*, 1992). Por otra parte el hecho de que algunas especies sean resistentes a la vancomicina causa preocupación (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. gallinarum*), sin embargo, éstos se llegan a encontrar en altas densidades en varios quesos, particularmente aquellos elaborados en los alrededores del Mediterráneo y se considera que ejercen un papel muy importante en el desarrollo de sabor (Maisnier-Patin *et al.*, 1996; Noskin *et al.*, 1997; Ogier *et al.*, 2008).

Estudios realizados por el grupo de investigación de Ogier *et al.*, (2008) sugieren que las cepas de *Enterococcus* tienen un efecto positivo en la maduración de quesos tradicionales, y que su presencia puede deberse a una contaminación directa de heces animales o indirecta por una fuente de agua contaminada, los equipos de la industria láctea y/o tanques de almacenamiento. Se estima que el número de *Enterococcus* presentes en las cuajadas de quesos elaborados en la región del Mediterráneo varía entre 10^4 - 10^6 UFC/g, mientras que en quesos ya madurados es de 10^5 - 10^7 UFC/g. Las especies aisladas con mayor frecuencia son *E. faecalis* y *E. faecium*, actualmente *E. durans* forma parte de las cepas del género que se aíslan a partir de productos lácteos.

Este género contribuye con el desarrollo del aroma en quesos como Cheddar, Feta, Water-buffalo Mozzarella, Cebreiro, Venaco, Hispánico, entre otros debido a la actividad proteolítica y la producción de diacetilo como producto del metabolismo del citrato (Tabla 3). Además muchas especies, principalmente de *E. faecalis* y *E. faecium* producen bacteriocinas con actividad frente a *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus*

aureus, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae* (Giraffa, 2003; Maisnier- Patin *et al.*, 1996; Ogier *et al.*, 2008; Simonetta *et al.*, 1997).

Tabla 3. Algunos quesos en los que se ha detectado la presencia del género *Enterococcus* (Ogier *et al.*, 2008)

Origen	Producto	Referencia
Francia	Queso Comté	Bouton <i>et al.</i> (1998)
Italia	Quesos tradicionales de leche de búfalo y cabra	Andrighetto <i>et al.</i> (2001)
	Queso tradicional Montasio	Marino <i>et al.</i> (2003)
	Queso Fiore Sardo tradicional	Cosentino <i>et al.</i> (2004)
	Queso Waterbuffalo Mozzarella	Villani and Coppola, 1994
Portugal	Quesos de leche de oveja de 4 regiones portuguesas registradas con denominación de Origen	Alves <i>et al.</i> (2004)
Grecia	Queso Feta	Manolopoulou <i>et al.</i> (2003)
España	Quesos artesanales (5 tipos)	Delgado <i>et al.</i> (2002);
	Queso Cebrerio elaborado con leche cruda de vaca	Centeno <i>et al.</i> (1996)
Eslovenia	Queso Tolminc	Canzek Majhenic <i>et al.</i> (2005)
Irlanda	Queso Cheddar	Gelsomino <i>et al.</i> (2001)

2.5 PAPEL DE LAS BAL EN LA INOCUIDAD DE LOS ALIMENTOS

2.5.1 Definición y producción de bacteriocinas

Las bacteriocinas se definen como péptidos o proteínas antibacterianas sintetizados por BAL las cuales poseen actividad antagonista con especies muy relacionadas filogenéticamente (Riley *et al.*, 2002). Algunas de ellas tienen un carácter inhibitorio contra las bacterias causantes de la descomposición de los alimentos y aquellas que

ocasionan riesgos a la salud de los consumidores de alimentos (Tagg *et al.*, 1976; Vignolo *et al.*, 1995).

La síntesis de estos compuestos se lleva a cabo por una clase particular de bacterias que presentan actividad bactericida contra otras, esta puede presentarse a nivel de especie (espectro cercano) o a nivel género (de amplio espectro) y, así como ocurre con los péptidos de defensa del hospedero, al parecer mecanismos de señalización celular se ven involucrados durante la síntesis. Una característica relevante de estos compuestos bactericidas, es que los microorganismos que las producen son resistentes a sus propias bacteriocinas; propiedad que se encuentra mediada por proteínas inmunes muy específicas (Cotter *et al.*, 2005).

2.5.2 Clasificación

La familia de bacteriocinas incluye una gran diversidad de proteínas clasificadas con base en su tamaño, microorganismos blanco, mecanismos de acción y mecanismos inmunológicos; siendo las más estudiadas las colicinas producidas por *Escherichia coli* y las producidas por diferentes especies de BAL por su importancia en la inocuidad alimentaria (Riley & Wertz, 2002).

En el 2005 Cotter *et al.*, (Figura 5) elaboraron la clasificación más actual de las bacteriocinas, distinguiendo dos clases o tipos cuyas características son las siguientes:

- ✚ Clase I: Bacteriocinas conteniendo residuos de lantionina (lantibióticos); que incluye a los lantibióticos compuestos por uno o dos péptidos.

- ✚ Clase II: Bacteriocinas sin residuos de lantionina, un grupo heterogéneo de péptidos de bajo peso que incluye a las *pediocinas* (subclase a), *di-péptidos* (subclase b), *cíclicas* (subclase c ó clase IV), *péptidos lineales* (subclase d).

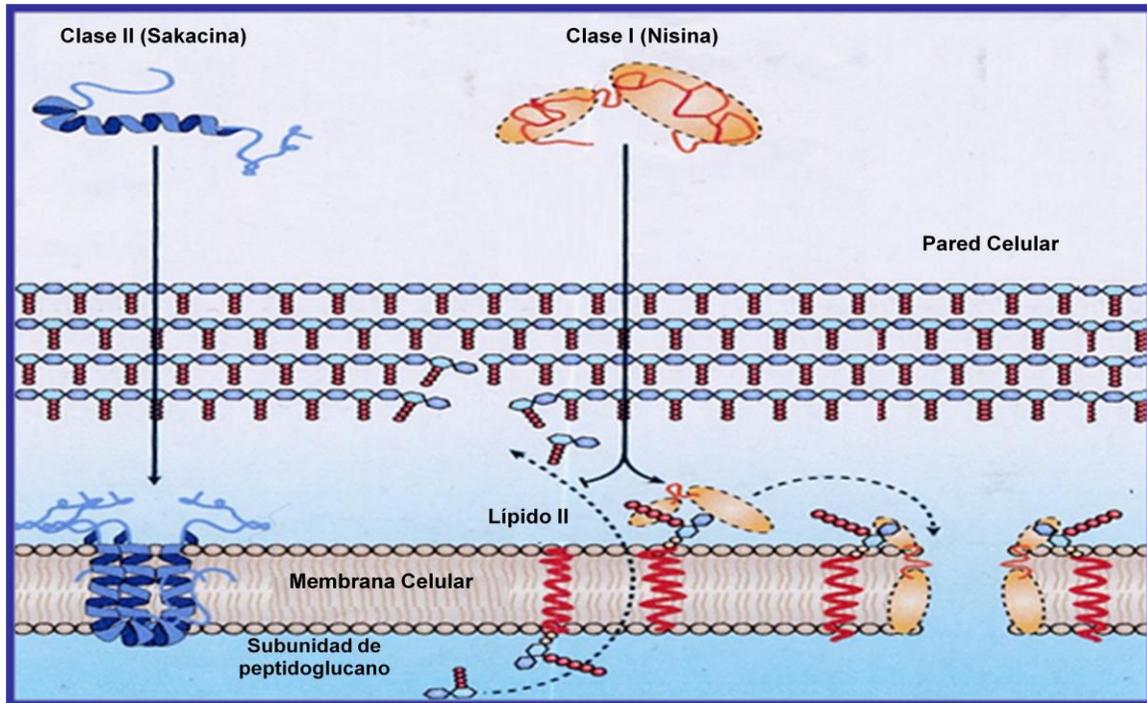


Figura 5. Mecanismo de acción para los dos tipos de bacteriocinas de acuerdo con *Cotter et al., 2005*.

2.5.3 Aplicaciones

Varios estudios (De Vuyst & Vandamme, 1994; Audisio, *et al.*, 2001) han sugerido que el empleo de las BAL productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores o de sus bacteriocinas como aditivos podría ser una vía muy efectiva para inhibir el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos patógenos como: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc. La aplicación de las bacteriocinas contra microorganismos causantes de la descomposición de alimentos, principalmente los patógenos, resulta de gran interés en productos mínimamente procesados como la carne, donde una acidez elevada es indeseable y el método de conservación recae exclusivamente de la refrigeración. La presencia de *L. monocytogenes* y *C. botulinum* en este tipo de productos ha ocasionado una gran preocupación, debido a que *L. monocytogenes* puede desarrollarse bajo temperaturas de refrigeración mientras que *C. botulinum* tienen la capacidad de producir esporas resistentes al calor, las cuales pueden

sobrevivir y germinar ante un mínimo procesamiento térmico, desarrollarse y producir toxinas en aquellos alimentos con nulo control de la temperatura.

Por otra parte, el uso de bacteriocinas en alimentos procesados térmicamente podría reducir la severidad en el tratamiento térmico incrementando de esta manera las propiedades nutricionales y características organolépticas de los mismos; minimizando también los costos debido al empleo de calor como método de conservación (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Un mecanismo por el que algunas BAL tienen actividad bactericida se debe a que compiten por los nutrientes con los microorganismos causantes de la descomposición, como en el caso de algunas bacterias Gram negativas (Campos *et al.*, 2006; Ponce *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que las BAL no ejercen el mismo efecto bactericida observado frente a las bacterias Gram positivas sobre las bacterias Gram negativas, debido a la resistencia que les provee su membrana externa. Sin embargo, también se ha podido detectar que tanto la nisina como algunas enterocinas pueden inhibir el desarrollo de este tipo de microorganismos, lo cual ha comenzado a cobrar interés (Rodríguez *et al.*, 2005; González *et al.*, 2003).

Rodríguez *et al.*, (2005) reportan el efecto antibacteriano que ejercen ciertas cepas BAL productoras de bacteriocinas durante la elaboración artesanal de quesos madurados. Reportan que el mayor grado de inhibición de *E. coli* O157:H7 se conseguía al emplear como cultivo iniciador una cepa de *Lactococcus lactis* modificada (*L. lactis* CL2) para producir dos bacteriocinas: nisina y pediocina después de 30 días de maduración. Esta inhibición se presentó como consecuencia de la combinación en la actividad bactericida inducida en la cepa empleada y la disminución del pH en el producto; así mismo, se planteó un posible daño causado sobre la membrana externa de este microorganismo, lo cual facilitaría el acceso de las bacteriocinas hacia la membrana citoplasmática y su muerte celular.

2.6 BACTERIOCINAS PRODUCIDAS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La producción de bacteriocinas dentro del grupo de las BAL es muy diversa. Dicha diversidad se encuentra relacionada principalmente con el microorganismo indicador empleado en la detección de las cepas productoras de compuestos antagonistas. Por otra parte, el espectro de inhibición que muchas de ellas presentan es amplio en comparación con otras que únicamente ejercen efecto sobre algunos cuantos microorganismos susceptibles a ellas.

La *Tabla 4* muestra algunas bacteriocinas producidas por ciertos grupos pertenecientes a las BAL:

<i>Tabla 4. Bacteriocinas producidas por algunos grupos de las BAL (De Vuyst & Vandamme, 1994b).</i>	
Cepa productora	Bacteriocina
<i>Lactococcus (L)</i>	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Nisina A
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> NIZO 22186	Nisina Z
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2130	Lactococcina A
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> LMG 2081	Lactococcina G
<i>Pediococcus (P)</i>	
<i>P. acidilactici</i> H, E, F, M	Pediocina AcH
<i>P. pentosaceus</i> N5p	Pediocina N5p
<i>Leuconostoc (Leuc)</i>	
<i>Leuc. carnostum</i> Lm1	Leuconocina Lem1
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> UL5	Mesenterocina 5
<i>Leuc. paramesenteroides</i> OX	Leuconocina S
<i>Streptococcus (S)</i>	
<i>S. thermophilus</i> STB40	Bacteriocina STB40
<i>S. thermophilus</i> SFi13	Termofilina 13
<i>S. thermophilus</i> St10	Bacteriocina St10

2.6.1 Propiedades físicas y químicas de las bacteriocinas

Una gran parte de las bacteriocinas presenta una sensibilidad muy peculiar con respecto a su inactivación por cambios en el pH y la temperatura. Algunas de las bacteriocinas producidas por la BAL únicamente son estables a pH ácidos y neutros, mientras que son inactivadas a valores de pH superiores a 8.0 (nisina, pediocina ACh, leucocina A-UAL187) (De Vuyst & Vandamme, 1994b).

La resistencia a temperaturas elevadas es una característica de las bacteriocinas secretadas por las BAL. La estabilidad puede presentarse dentro de un amplio rango de relaciones temperatura- tiempo como son: 60°C o 100°C por un tiempo mayor a los 30 min (lactocina 27, lactocina S), temperaturas de autoclave 121°C durante 15-20 min (lactacina B, lactacina F, nisina).

Con base en su estructura primaria, peso y estabilidad térmica, las bacteriocinas de las LAB pueden clasificarse en las siguientes tres clases (De Vuyst & Vandamme, 1994b):

- I. Bacteriocinas lantibióticas pequeñas (19-37 aminoácidos) y con estabilidad térmica; ejemplos de este tipo son nisina, lacticina 481, lactocina S.
- II. Bacteriocinas no lantibióticas de bajo peso (<15 000 Da): con cierta estabilidad térmica (> de 30 min a 100°C o por 15 min a 121°C); distinguiéndose dentro de este grupo a las diplococcinas, lactococcina A, sakacina A, pediocina PA-1.
- III. Bacteriocinas no lantibióticas de alto peso (> 15 000 Da) sensibles al calor (se inactivan a temperaturas entre 60-100°C por tiempos de 10-15min); como ejemplo se tiene: helveticina J, lacticina A y B, caseicina 80.

Una de las explicaciones que se han dado respecto a la estabilidad térmica de las bacteriocinas tiene que ver con la formación de pequeñas estructuras globulares y la existencia de regiones altamente hidrofóbicas (lactacina F, lactococcina A, nisina), enlaces entrecruzados (nisina, lacticina 481, lactocina S) y un alto contenido de glicinas

en los péptidos (diplococcina, lactacina F, lactocina 27) (De Vuyst & Vandamme, 1994b).

2.6.2 Heterogeneidad en el tamaño de las bacteriocinas

Dentro del grupo de las BAL la producción y peso molecular de las bacteriocinas varía considerablemente, pues pueden sintetizar desde péptidos pequeños (lacticina 481, 1700 Da), agregados proteína-proteína, lípido-proteína, hasta macromoléculas con pesos moleculares por arriba de 200 000 Da (lactocina 27, lactacina B, lactacina F, helveticina J) (De Vuyst & Vandamme, 1994b).

Así mismo, especies pertenecientes al mismo género pueden producir bacteriocinas que difieren ampliamente en peso molecular. Un ejemplo de este comportamiento se observa con la bacteriocina lactacina B sintetizada por *L. acidophilus* N2, la cual pertenece a la clase de péptidos con menor tamaño producida por las especies de *Lactobacillus* cuyo peso aparente es de 6 500 Da; mientras que las bacteriocinas producidas por *L. helveticus*: lactocina 27 de 12 400 Da y helveticina J de 3 700 Da corresponden a las bacteriocinas de mayor tamaño dentro de dicha especie.

2.6.3 Algunas bacteriocinas producidas por los géneros de BAL aisladas del queso Cotija

Como se mencionó anteriormente, se han logrado aislar del queso Cotija los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* que tienen la capacidad para producir bacteriocinas.

De acuerdo con Nes *et al.*, (2007), las bacteriocinas provenientes del género *Enterococcus* pertenecen principalmente a la Clase II: no lantibióticas y estables a la temperatura, exceptuando la llamada *citolisina*; un dipéptido lantibiótico encontrado en *E. faecalis* que presenta actividad citolítica (hemolítica). Así mismo, ha sido ampliamente aceptado que la gran mayoría de las bacteriocinas de la Clase II son del tipo pediocinas (Clase IIa) con una fuerte actividad anti-*Listeria*. Entre estas, la

enterocina A frecuentemente aislada a partir de cepas de *E. faecium*, es la más caracterizada. Para el correcto funcionamiento de las bacteriocinas con doble péptido (Clase IIb) se requiere la acción complementaria de ambos, y solo una proteína de inmunidad tiene efecto sobre la actividad de este tipo de bacteriocinas.

Gran parte de las bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus* han sido aisladas a partir de alimentos (quesos, carne, pescado y vegetales), animales y humanos. La *Tabla 5* muestra algunas de las bacteriocinas producidas por el género *Enterococcus*, su clasificación y tamaño.

Tabla 5. Algunas bacteriocinas detectadas en cepas del género <i>Enterococcus</i> (Nes et al., 2007)			
Organismo	Bacteriocina	Tipo	Masa (Da)
<i>E. faecalis</i>	Citolisina Cyl_L, y Cyl_S	Clase I : lantibiótica con doble péptido	3,458 (38), 2,032 (21)
<i>E. faecium</i>	Enterocina A	Clase IIa: tipo pediocina	4,829 (47)
<i>E. faecium</i>	Enterocina P	Clase IIa: tipo pediocina	4,493 (44)
<i>E. faecium</i>	Bac 32	Clase IIa: tipo pediocina	7,998 (70)
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina GM-1	Clase IIa: tipo pediocina	4,630 (44)
<i>E. faecalis</i>	Bac 31	Clase IIa: tipo pediocina	(43)
<i>E. mundtii</i>	Mundticina ATO6, Mundticina KS, Enterocina CRL35, Mundticina QU2	Clase IIa: tipo pediocina	4,287 (43)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina SE-K4	Clase IIa: tipo pediocina	5,356.2 (43)
<i>E. faecium</i>	Bacteriocina T8	Clase IIa: tipo pediocina	5,090 (44)
<i>E. faecium</i>	Enterocina B	Clase II, sin subclase	5,479 (53)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina 1071A, Enterocina 1071B	Clase IIb: doble péptido	4,285 (39) 3,897 (35)
<i>E. faecalis</i>	MR10A MR10B	Clase IIc, precursor	5,202 (44) 5,208 (43)
<i>E. faecium</i>	Enterocina L50;	Clase IIc, precursor	5,190 (44)

	L50A, L50B		5,178 (43)
<i>E. faecium</i>	Enterocina Q	Clase IIc, precursor	3,980 (34)
<i>E. faecalis</i>	Enterocina EJ97	Clase IIc, precursor	5,328 (44)
<i>E. faecium</i>	Enterocina RJ-11	Clase IIc, precursor	5,049 (44)
<i>E. faecalis</i>	AS-48	Clase II d: bacteriocina cíclica	7,166 (70)

El género *Lactobacillus* es ampliamente reconocido por su capacidad para producir bacteriocinas. Se han logrado aislar, purificar y caracterizar varios péptidos pertenecientes a la clase II que son estables al calor y de un alto peso molecular, entre ellos la curvacina A, sakacina A y P, lactacina B y F (Tabla 6).

Por otra parte, también se ha reportado la producción de bacteriocinas más complejas asociadas con otros lípidos o carbohidratos, unión que es necesaria para garantizar la actividad antibacteriana de estos compuestos.

Tabla 6. Algunas bacteriocinas producidas por el género <i>Lactobacillus</i>		
Organismo	Bacteriocina	Referencia
<i>L. acidophilus</i> TK8912	Acidocina 8912	Kantana <i>et al.</i> (1992)
<i>L. acidophilus</i> CH5	Acidocina CH5	Chumchalová <i>et al.</i> (1995)
<i>L. brevis</i>	Brevicina	Toba <i>et al.</i> (1991) Benoit <i>et al.</i> (1994)
<i>L. casei</i> B80	Caseicina 80	Rammelsberg & Radler (1990)
<i>L. casei</i> CRL705	Lactocina 705	Vignolo <i>et al.</i> (1996)
<i>L. curvatus</i> LTH 1174	Curvacina A	Holck <i>et al.</i> (1992)
<i>L. helveticus</i> LP27	Lactocina 27	Upreti & Hinsdill (1973)
<i>L. helveticus</i> 481	Helveticina J	Joerger &Klaenhammer (1986)
<i>L. pentosus</i>	Pentocina TV35b	Okkers <i>et al.</i> (1999)
<i>L. pentosus</i> ST151BR	Bacteriocina ST151BR	Todorov & Dicks (2004)

<i>L. plantarum</i>	Plantaricina A	Nissen-Meyer <i>et al.</i> (1993)
<i>L. plantarum</i>	Plantaricina S	Jímenez-Díaz <i>et al.</i> (1995)
<i>L. plantarum</i>	Plantaricina 149	Kato <i>et al.</i> (1994)
<i>L. plantarum</i>	Plantaricina KW30	Asmundson <i>et al.</i> (1994) Kelly <i>et al.</i> (1994)
<i>L. plantarum</i>	Plantaricina 35d	Messi <i>et al.</i> (2001)
<i>L. plantarum</i>	Bacteriocina ST28MS Bacteriocina ST26MS	Todorov & Dicks (2004)
<i>L. sake</i> Lb706	Sakacina A	Schillinger & Lucke (1989)
<i>L. sake</i> L45	Lactocina S	Mortvedt & Nes (1990)
<i>L. salivarius</i> subsp. salicinius T140	Salivacina 140	Arihara <i>et al.</i> (1993)

2.7 DETECCIÓN DE CEPAS PRODUCTORAS DE BACTERIOCINAS

Existen diversas metodologías para la detección de cepas productoras de bacteriocinas. Estos pueden dividirse en: métodos directos e indirectos. La mayoría se fundamenta en la difusión de las bacteriocinas a través de un medio de cultivo sólido o semi-sólido para inhibir el crecimiento de un microorganismo indicador que es sensible a ellas (De Vuyst & Vandamme, 1994b; Yaakoubi *et al.*, 2009).

2.7.1 Métodos indirectos (De Vuyst & Vandamme, 1994b)

Estos se caracterizan por la pre-incubación de la cepa productora de bacteriocinas en un medio apropiado para permitir su producción; las células se eliminan o inactivan previo a la inoculación del medio con el microorganismo indicador y se favorece su crecimiento. En algunas ocasiones, la cepa productora no se elimina durante la primera incubación, sino que se separa físicamente del microorganismo indicador (estriado del agar e inoculación de la superficie opuesta).

2.7.1.1 Técnica de la gota sobre la superficie (*spot-on-the-lawn*)

La característica de esta técnica consiste en colocar sobre una base de agar gotitas de la cepa productora de bacteriocinas, la cual es incubada durante la noche para desarrollar colonias individuales. Posteriormente se coloca una sobrecapa del medio empleado el cual ha sido inoculado con el microorganismo indicador y nuevamente es incubada para generar zonas de inhibición.

2.7.1.2 Técnica del estriado (*flip-streak method*)

Como su nombre lo indica, el método consiste en estriar sobre la superficie de un medio óptimo la cepa que se adjudica como productora de bacteriocinas, se deja crecer y a continuación se estria en área contraria del medio el microorganismo indicador.

2.7.2 Métodos Directos (De Vuyst & Vandamme, 1994b)

Se diferencian de los métodos indirectos por el crecimiento simultáneo del microorganismo indicador y la cepa productora de bacteriocinas, y en que la demostración de la actividad antagonista de ésta depende de la liberación al medio, en etapas tempranas a su crecimiento, de una sustancia que tenga la capacidad de difundir e inhibir al otro.

2.7.2.1 Técnica difusión en agar (well-diffusion method)

En esta técnica se emplean sobrenadantes obtenidos a partir de los cultivos en medio líquido de las cepas productoras de bacteriocinas, los cuales son colocados en pozos efectuados sobre un medio que ha sido inoculado con un microorganismo susceptible. Posterior a la incubación se miden los halos de inhibición obtenidos (*Figura 6*).

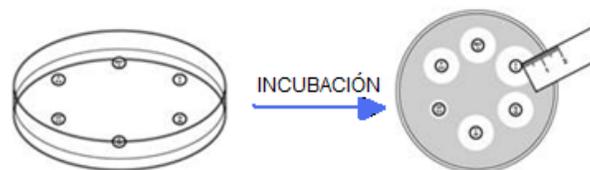


Figura 6. Métodos Directos: Técnica difusión en agar.

A pesar de que algunas de estas técnicas son ampliamente usadas, presentan algunas limitaciones con respecto a la sensibilidad y posibilidad para excluir otras sustancias inhibitorias. La precisión depende fuertemente de factores como: el medio, su composición, el pH y la facilidad para la difusión de los compuestos antibacterianos, los microorganismos indicadores y el inóculo de los mismos.

2.7.3 Puntos importantes en la detección de cepas productoras de bacteriocinas

Algunas de las consideraciones que se deben tomar, independientemente del método empleado, en la detección de cepas productoras de bacteriocinas para descartar que la actividad inhibitoria observada se deba a otros factores y/o presencia de sustancias son las siguientes (De Vuyst & Vandamme, 1994b):

- ④ Emplear una amplia variedad de medios de cultivo y condiciones de crecimiento para la cepa a probar, dado que en muchas ocasiones dichas condiciones no resultan ser adecuadas para la producción máxima de bacteriocinas.
- ④ Emplear un pH neutralizado, para descartar el efecto inhibitorio por parte de metabolitos generados como parte del crecimiento de la cepa en estudio.
- ④ Emplear controles negativos y positivos en cada uno de los ensayos a realizar con la cepa adjudicada como productora de bacteriocinas.

2.8 PURIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS: COMPOSICIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

En numerosos estudios se ha observado que la estabilidad de las bacteriocinas disminuye de manera considerable al incrementarse la purificación de las mismas (De Vuyst & Vandamme, 1994b; Moreno *et al.*, 2002).

La purificación de bacteriocinas no resulta fácil, algunas de las complicaciones se encuentran relacionadas con la tendencia que tienen para asociarse con otras moléculas. Por otra parte, son un grupo muy heterogéneo, por lo que un protocolo de purificación específico para cada bacteriocina generalmente se obtiene al realizarlo empíricamente (De Vuyst & Vandamme, 1994).

Para propósitos de purificación, es necesario efectuar estudios sobre la fase óptima para su síntesis, comenzando con grandes cultivos previo al proceso de purificación de las bacteriocinas. Las condiciones de incubación, particularmente la temperatura, pH y tiempo influyen fuertemente en el rendimiento de bacteriocinas con actividad eficiente. Para cada microorganismo productor de compuestos bactericidas, las condiciones óptimas para su obtención deberán establecerse de manera empírica (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997).

La composición del medio de cultivo afecta la producción de bacteriocinas de manera individual (Settanni *et al.*, 2008). Las BAL son generalmente cultivadas en medios complejos como el MRS (Man- Rogosa –Sharpe), caldo láctico Elliker (ELB), MI7 y APT (Tween para todo propósito) (Parente & Hill, 1992). Todos ellos contienen cantidades significativas de péptidos con un rango de peso molecular correspondiente a la mayoría de las bacteriocinas (3000-6000 Da) (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997). Así mismo, la presencia de extracto de levadura, Tween 80 y el pH en los medios, tienen una influencia marcada en la producción de bacteriocinas (Parente & Hill, 1992).

Audisio, *et al.*, (2001) comprobaron que *Enterococcus faecium* posee un complejo sistema enzimático que le permite emplear como fuente de carbono a la sacarosa además de otras fuentes, sin que ello afecte la producción de bacteriocinas. En dicho estudio probaron medios de cultivo suplementados con diferentes fuentes de carbono: azúcar blanca, azúcar morena, además de subproductos del proceso de refinación: melazas, bagazo y jugos de extracción, todos ellos ricos en carbohidratos, principalmente sacarosa, glucosa y fructosa. Los resultados obtenidos les permitieron establecer que la producción de bacteriocinas por *Enterococcus faecium* es mayor en presencia tanto de azúcar morena como de glucosa, dado que en el último caso se trata de un carbohidrato de bajo peso y fácil accesibilidad para la producción de energía; por otra parte, cuando la fuente de carbono la proveía el bagazo no se observaba producción alguna de estos compuestos bactericidas.

JUSTIFICACIÓN

Del queso Cotija se han aislado BAL de los géneros *Enterococcus* (*E. faecalis* y *E. faecium*) y *Lactobacillus* (*L. pentosus*, *L. brevis* y *L. paracasei*), especies para las que existen reportes de producción de compuestos con acción antibacteriana.

Dado que el proceso de elaboración del queso Cotija es artesanal, cabe la posibilidad de que se pudieran presentar otros microorganismos además de la cuenta alta de coliformes detectada en etapas tempranas a la de maduración, que pudieran causar la alteración del mismo,

El propósito de este trabajo es determinar qué tipo de microorganismos son susceptibles a estos compuestos. Así mismo, es necesario determinar cuál es el efecto del pH, temperatura y fuerza iónica sobre esta actividad. Con lo anterior se obtendrá información sobre la posibilidad de que estas sustancias contribuyan a la inocuidad del queso, lo que resulta de interés debido a que éste se elabora con leche cruda y las medidas higiénicas deben ser muy estrictas.

3. HIPÓTESIS

La disminución en la carga microbiana durante el proceso de maduración se debe, adicionalmente al ambiente fisicoquímico del queso Cotija, a la producción de actividad bactericida proveniente de las BAL presentes de manera natural en el queso; por lo que será posible caracterizar y comprobar el efecto antagónico que ejercen sobre microorganismos indicadores y de importancia en salud.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivos Generales

- Determinar el espectro de inhibición de los compuestos extracelulares de las cepas enumeradas contra microorganismos:
 - ✦ De interés sanitario: *S. aureus*, *Salmonella* serovar typhimurium y *E. coli*.
 - ✦ Relacionados filogenéticamente: *E. faecium*, *E. faecalis*, *L. pentosus*, *L. paracasei* y *L. brevis*.
 - ✦ Otros microorganismos Gram positivos (indicadores): *L. innocua*, *Streptococcus sp.*, *L. lactis*, *P. pentosaceus* y *M. lysodeikticus*.
- Efectuar la caracterización de los compuestos antibacterianos extracelulares en función del pH, la fuerza iónica y la temperatura.

5. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

5.1 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS PRODUCTORAS

Se analizó el efecto antagonista de algunas cepas de BAL productoras de compuestos antibacterianos aisladas previamente del queso Cotija artesanal contra algunos microorganismos Gram positivos y negativos. Las cepas de BAL que han sido identificadas mediante métodos moleculares (secuenciación de la región V3 del gen ARNr 16S (Zuñiga, B. 2009) son tres cepas de *Enterococcus faecium* y tres cepas de *Enterococcus faecalis*. Por métodos bioquímicos (API) (Bravo, A. 2008) se identificaron una cepa de *Lactobacillus pentosus*, una cepa de *Lactobacillus paracasei* y una cepa de *Lactobacillus brevis* (Delgado, E. 2009).

Los microorganismos indicadores empleados, están integrados por cepas Gram positivas en su mayoría debido a los extensos reportes sobre el efecto antagonista que los compuestos antibacterianos producidos por las BAL ejercen sobre ellas. Dentro de dicho grupo también se tiene cepas relacionadas filogenéticamente con las productoras de los compuestos con actividad antibacteriana, es decir, los géneros que se han logrado aislar del queso Cotija.

Así mismo, se ensayó el efecto antibacteriano de los compuestos extracelulares provenientes de las BAL sobre dos cepas Gram negativas, una de las cuales resulta de importancia en los alimentos por ser de los microorganismos con mayor incidencia en las enfermedades transmitidas por el consumo de productos lácteos.

5.1.1 Cepas de identidad conocida

Tabla 7. Listado de las cepas productoras e indicadoras con sus respectivos medios de cultivo (cepas BAL aisladas del queso Cotija)

Microorganismo	Medio de Cultivo
<i>Enterococcus faecalis</i>	APT
<i>Enterococcus faecium</i>	APT
<i>Lactobacillus paracasei</i>	MRS
<i>Lactobacillus brevis</i>	MRS
<i>Lactobacillus pentosus</i>	MRS

Tabla 8. Listado de los microorganismos indicadores empleados con sus respectivos medios de cultivo

Microorganismo	Medio de Cultivo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α **	Luria
<i>Lactococcus lactis</i> *	MRS
<i>Listeria innocua</i> ****	MRS
<i>Micrococcus lysodeikticus</i> ****	BHI
<i>Salmonella</i> serovar typhimurium ****	BHI
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ****	MRS
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC5638 ***	BHI
<i>Streptococcus sp.</i> ****	BHI

*Cepa proporcionada por la Dra. Carmen Wachter

**Cepa proporcionada por la M.C. Carolina Peña

***Cepa proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química

****Cepas del Laboratorio 312, Conjunto E

Se emplearon las cepas de BAL de identidad conocida listadas anteriormente, así como los diversos microorganismos indicadores para el desarrollo del espectro de inhibición. Así mismo se muestra el medio óptimo de cultivo para cada una, todas ellas almacenadas a -20°C en perlas de vidrio perforadas con glicerol al 15% (Tablas 7 y 8).

5.2 ESPECTRO DE SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA

En la *Figura 7* se muestra el diagrama experimental.

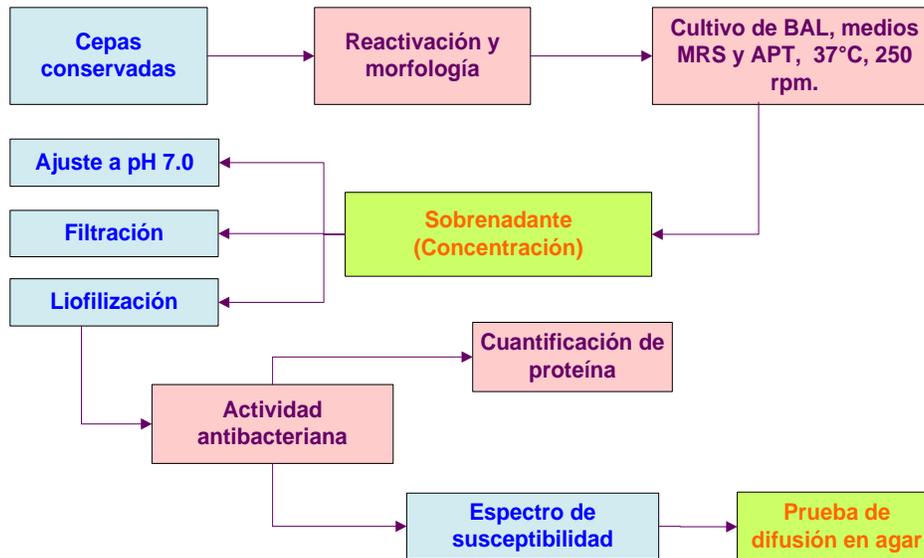


Figura 7. Diagrama de trabajo de obtención de compuestos antibacterianos y espectro de susceptibilidad

5.2.1 Reactivación de las cepas de BAL

Se inocularon de 2-3 perlas de vidrio perforadas en 10 mL de caldo APT (All Purpose Tween), MRS (Man Rogosa Sharpe). La incubación durante 24 horas se llevó a cabo en una incubadora bajo las condiciones citadas en la *Tabla 9* (Gravity Convection, Mod. E-71).

Una vez concluido el tiempo de incubación de cada cepa, se efectuó una tinción de Gram, observándose al microscopio con la finalidad de corroborar la pureza de las mismas. Adicionalmente, las cepas de *L. brevis* y *L. pentosus* fueron conservadas a -20°C en viales con perlas de vidrio perforadas y medio óptimo líquido adicionado con glicerol (15%) como agente crioprotector. El resto de las cepas ya se encontraban conservadas mediante la forma descrita (La metodología detallada se encuentra en el Anexo I).

5.2.2 Cultivo en Matraz

5.2.2.1 Preparación preinóculo

Se inocularon 3 perlas de vidrio perforadas en matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, conteniendo 20 mL del medio de cultivo apropiado para cada cepa. Posteriormente fueron incubados con agitación durante 24 h a 37° C (Incubadora New Brunswick, Mod. INNOVA 4000; ver *Tabla 9*).

5.2.2.2 Inóculo

En matraces Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL del medio apropiado se adicionó el 2% del preinóculo, incubando bajo las mismas condiciones citadas. Se finalizó la fermentación de cada cepa una vez alcanzada la fase logarítmica tardía o estacionaria temprana según lo reportado por Delgado, E., 2009.

Tabla 9. Condiciones de incubación para los cultivos en líquido de las BAL del queso Cotija

Microorganismo	Medio de cultivo	Fase log tardía (h)	Fase Est. temprana (h)	Temperatura (°C)	Incubación/ condición
<i>E. faecalis (A)</i>	APT	6	8	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>E. faecium (B)</i>	APT	6	8	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>E. faecium (C)</i>	APT	6	8	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>E. faecalis (D)</i>	APT	5	8	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>E. faecium (E)</i>	APT	5	8	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>L. paracasei (F)</i>	MRS	10	13	37°C	Agitación/ 250 rpm
<i>E. faecalis (G)</i>	MRS	7	10	37 °C	Agitación/ 250 rpm
<i>L. brevis (H)</i>	MRS	10	12	37°C	Agitación/ 250 rpm
<i>L. pentosus (I)</i>	MRS	9	12	37°C	Agitación/ 250 rpm

Nota: Para las especies de *Enterococcus* utilizadas en este trabajo, se ha reportado que las bacteriocinas se producen en la fase logarítmica tardía y/o en la fase estacionaria temprana (Maisnier- Patin *et al.* 1996).

5.2.3 Obtención de los sobrenadantes

Concluido el tiempo de fermentación, se separó la biomasa del sobrenadante por centrifugación bajo las siguientes condiciones: 10, 000 rpm durante 20 min. y una temperatura de 4°C (Centrifuga BECKMAN, Mod. J2-4C).

5.2.4 Concentración de los sobrenadantes

Los sobrenadantes obtenidos de cada fermentación fueron ajustados a un pH de 7.0, con NaOH al 50%. Se pasaron a través de una membrana de 0.45 μm (Millipore), colectando el filtrado (25 mL) en botes de plástico estériles. Finalmente se congelaron a -70° C y liofilizaron (LABCONCO, Freezer Dry System).

Los sobrenadantes liofilizados se almacenaron a 4°C hasta el momento en que se resuspendieron para continuar con su estudio.

5.2.5 Determinación de proteína

Cada uno de los sobrenadantes liofilizados fue resuspendido en 2.5 mL de Buffer de Fosfatos (PBS) 100 mM, pH 7.0 y a esta muestra se le determinó la proteína.

5.2.5.1 Técnica empleada

- Efectuar una dilución 1:100 del sobrenadante resuspendido.
- Tomar 800 μl de la muestra diluida y adicionar 200 μL del reactivo de Bradford (BIO-RAD).

Las lecturas se realizaron a una $\text{Abs}_{595\text{nm}}$ en un espectrofotómetro (Espectronic, Mod. 21D).

Las absorbancias registradas se interpolaron en una curva patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA) (0-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$) para determinar la concentración de proteína de cada una de las cepas de BAL en estudio.

5.2.6 PRUEBAS PRESUNTIVAS POR DIFUSIÓN EN AGAR

5.2.6.1 Listado de microorganismos indicadores

A continuación se enlistan los microorganismos indicadores seleccionados para determinar el espectro de inhibición, así como las condiciones de incubación previamente establecidas por el grupo de trabajo para cada uno de acuerdo al medio óptimo de crecimiento (ver *Tabla 10*).

<i>Tabla 10. Condiciones de incubación para microorganismos indicadores</i>			
Cepa	Fase log tardía (horas)	Temperatura(°C)	Incubación
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	3	37 °C	Estático
<i>Lactococcus lactis</i>	12	37 °C	Estático
<i>Listeria innocua</i>	12	37 °C	Estático
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	12	37 °C	Estático
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	12	29°C	Estático
<i>Salmonella</i> serovar typhimurium	4	37 °C	Estático
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	37 °C	Estático
<i>Streptococcus sp.</i>	6	37 °C	Estático

5.2.6.2 Reactivación de cepas

Se inocularon de 2 a 3 perlas de vidrio perforadas en 20 mL de caldo Infusión Cerebro-Corazón (BHI), Luria, APT o MRS estéril, y se incubaron de acuerdo a las condiciones establecidas (*Tablas 9 y 10*).

5.2.6.3 Cultivo en matraz

Culminado el proceso de reactivación, se tomó 2% del cultivo y se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL, con 50 mL del medio apropiado, los cuales fueron incubados.

Se detuvo la fermentación una vez alcanzada la fase logarítmica (*Tablas 9 y 10*) (Anexo I).

5.2.6.4 Césped bacteriano

Se efectuaron diluciones decimales (10^{-1} hasta 10^{-6} usando solución salina isotónica al 0.85% estéril, pH 7.0). Posteriormente se colocaron 20 μ L de cada una (por triplicado) sobre placas de agar BHI, MRS o Luria al 1% y se incubaron durante 24 h de acuerdo a las condiciones descritas (Anexo I).

Para determinar la cuenta se seleccionó aquella dilución que presentaba mayor uniformidad en el césped bacteriano formado para cada microorganismo.

5.2.6.4 Difusión en agar

5.2.6.4.1 Selección de la fase óptima de crecimiento para la producción de compuestos antibacterianos por parte de las cepas de BAL

1. Se emplearon placas con 15 mL de medio base sólido al 1% (agar) para cada microorganismo indicador (medios BHI, Luria, APT o MRS, dependiendo del microorganismo).
2. Posteriormente se colocaron 10 mL de agar BHI, Luria, APT o MRS suave (0.8%) inoculados con 20 μ L de la dilución con mayor homogeneidad en crecimiento.
3. Se realizaron pozos en las placas con ayuda de un cilindro de plástico de aproximadamente 9 mm de diámetro, los cuales se llenaron con 250 μ L de cada uno de los sobrenadantes resuspendidos de las BAL a probar.
4. Las placas se incubaron durante 24-42 h a 29 o 37°C, de acuerdo al microorganismo en estudio.

Interpretación de resultados: se midió el halo de inhibición alrededor del pozo usando un Vernier.

5.3 Obtención de compuestos antibacterianos en la fase óptima de crecimiento

Siguiendo el protocolo descrito en la Sección 5.2 (apartados 5.2.2 a 5.2.4), una vez alcanzada la fase estacionaria temprana de crecimiento se cosecharon los sobrenadantes de las cepas de BAL (*Tabla 9*) y se procedió a efectuar la prueba de difusión en agar descrita con anterioridad.

La actividad antibacteriana se analizó trabajando con los microorganismos indicadores *S. aureus* ATCC 6538 y *E. coli* DH5 α de acuerdo con las condiciones listadas en la *Tabla 10*; colocando en cada uno de los ensayos los siguientes controles:

- Ⓒ Lisostafina (SIGMA®), proteína con una importante actividad lítica frente al género *Staphylococcus* al destruir su pared celular.
- Ⓒ Lisozima (Research Organics), enzima lítica que actúa rompiendo el enlace glicosídico 1-4 del peptidoglucano de las bacterias Gram (+); pero no tiene acción frente a las Gram (-).
- Ⓒ Nisaplin®, producto comercial cuyo compuesto activo es la nisina, una bacteriocina natural producida por *L. lactis*, con actividad frente a una gran cantidad de bacterias Gram (+) incluyendo a los géneros *Listeria*, *Clostridium*, *Bacillus* y las BAL; causando su muerte, inhibiendo el desarrollo de células vegetativas (destrucción de membrana citoplasmática) o el crecimiento de esporas termorresistentes.

5.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

5.3.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS CON MAYOR ACTIVIDAD

De acuerdo a los resultados obtenidos en las pruebas presuntivas por difusión en agar, se seleccionaron aquellas cepas de BAL con mayor actividad antibacteriana. Con base en el criterio anterior las cepas seleccionadas fueron:

- Ⓢ *L. paracasei* (cepa F)
- Ⓢ *E. faecalis* (cepa G)
- Ⓢ *L. brevis* (Cepa H)
- Ⓢ *L. pentosus* (Cepa I)

Para todas las cepas, la fermentación se detuvo una vez alcanzada la fase estacionaria temprana de crecimiento, durante la que se logró observar la mayor actividad antibacteriana. La *Figura 8* muestra el diagrama de trabajo seguido para efectuar la caracterización de los sobrenadantes crudos de las cepas de BAL aisladas del queso Cotija.

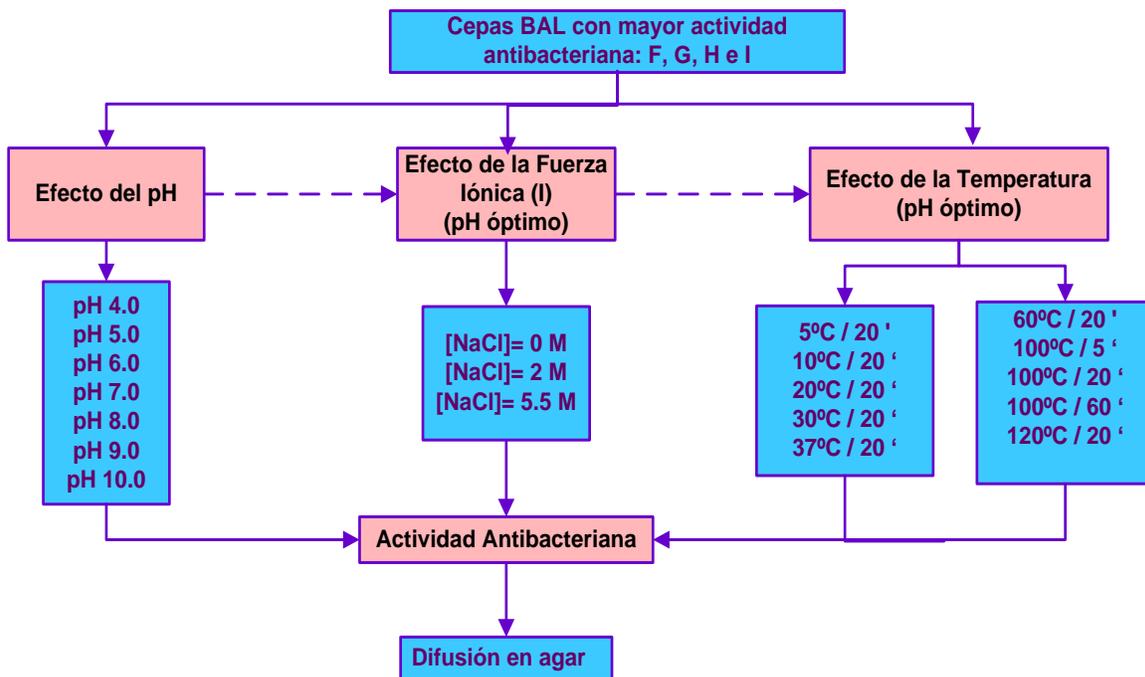


Figura 8. Caracterización de los sobrenadantes crudos y concentrados de las BAL del queso Cotija.

5.4.2 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

5.4.2.1 Selección de los amortiguadores para los ensayos posteriores de pH

Como primer paso se seleccionaron diferentes buffers cuyo rango de amortiguación se situara entre pH ácidos y alcalinos (4.0-10.0); debido a los diversos reportes en los que se ha señalado la estabilidad de los compuestos antibacterianos secretados por las BAL, principalmente a valores de pH ácidos. Se mencionó previamente, que el queso Cotija madurado tiene un pH entre 4.8-5.2, debido a lo cual la caracterización se inició bajo estas condiciones de acidez.

A continuación se enlistan los buffers escogidos para la caracterización de este parámetro:

Tabla 11. Sistemas amortiguadores de pH, pKa's e intervalos de uso			
Amortiguador	pKa	Intervalo de pH valido	pH trabajado
Acetatos	4.76	4.8-5.2	4.0 y 5.0
CHES*	9.55	8.6-10.0	10.0
HEPES*	7.55	7.0-8.0	7.0
MES*	6.15	5.5-6.7	6.0
Tris*	8.0	7.6-9.6	8.0 y 9.0

*Buffers inertes que no reaccionan con ningún otro componente

Se prepararon 250 mL de una mezcla de los sistemas de amortiguadores de pH listados a una concentración 20 mM. Se tomaron muestras de 30 mL, a las que se ajustó el pH dentro del intervalo comprendido entre 4.0 y 10.0, incrementando el valor en una unidad. Los buffers ajustados se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

5.4.2.2 Realización del ensayo

Una vez obtenidos los sobrenadantes de las cuatro cepas de BAL con mayor actividad antibacteriana, y con la variante de duplicar a 200 mL el volumen de cada cultivo líquido cosechado, concentrado y liofilizado, se efectuó el procedimiento que se muestra en la *Figura 9*.

- Se descongelaron los amortiguadores de pH y esterilizaron a través de una membrana de 0.22 μm (Milex G.S., Millipore), recolectando en tubos Falcon de 50 mL estériles.
- En tubos Eppendorf estériles de 2.0 mL, se peso por septuplicado 500 mg de cada uno de los sobrenadantes liofilizados de las cepas de BAL con mayor actividad.
- Se resuspendieron los sobrenadantes en 500 μL del buffer correspondiente a cada valor de pH a probar.
- Se emplearon placas con 15 mL de medio base sólido al 1% apropiado para cada microorganismo indicador: *S. aureus* y *E.coli*.

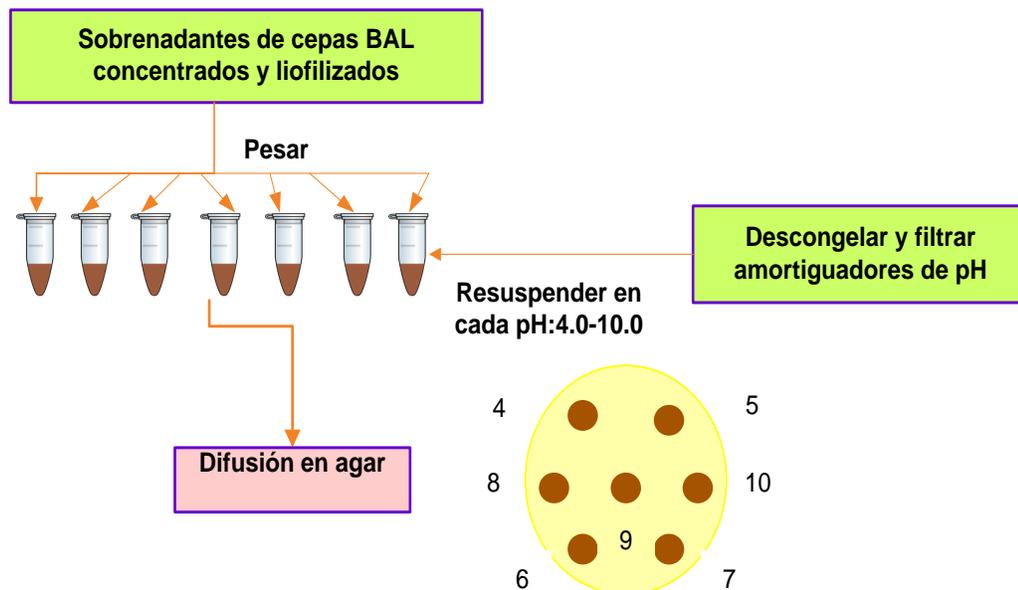


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las BAL del queso Cotija.

-
-
- e. Posteriormente se colocaron 10 mL de agar BHI o Luria suave (0.8%) inoculados con 20 μ L de la dilución 10^{-2} de cada microorganismo.
 - f. Se realizaron 7 pozos en cada una de las placas (9 mm de diámetro) y se llenaron con 250 μ L de los sobrenadantes crudos resuspendidos a los diferentes pH de prueba.
 - g. Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C.
 - h. Se realizó una caja control para cada microorganismo colocando 250 μ L de cada uno de los buffers empleados.

5.4.3 EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA ([NaCl]) SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

5.4.3.1 Selección del pH óptimo de trabajo para cada cepa de BAL

Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de la Sección 5.3.2.2, fue seleccionado el pH al cual se observó una mayor actividad inhibitoria para cada una de las cepas de BAL.

5.4.3.2 Realización del ensayo (Figura 10).

- a) Se prepararon soluciones salinas de concentraciones 2.0 y 5.5 M que corresponden a las fuerzas iónicas 0.3422 y 0.9411 respectivamente (V= 20 mL).
- b) Posteriormente se tomaron 5 mL de cada solución y se ajusto el pH con base en el valor óptimo donde se registró la mayor actividad inhibitoria por parte de las cepas de BAL.
- c) Ajustado el pH de las muestras, se filtró 1.5 mL de cada una con ayuda de una membrana de 0.22 μ m (Milex G.S, Millipore); recolectando el contenido en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles.

- d) Se pesaron por triplicado 500 mg de los sobrenadantes de las BAL a probar en tubos Eppendorf de 2.0 mL estériles.
- e) La resuspensión de los sobrenadantes se efectuó conforme las condiciones:
- ⓐ Concentración NaCl= 0; resuspender en 500 μ L buffer óptimo para cada cepa de BAL.
 - ⓑ Concentración NaCl= 2.0 M; resuspender en 500 μ L de la solución salina ajustada al pH óptimo de cada cepa BAL.
 - ⓒ Concentración NaCl= 5.5 M; resuspender en 500 μ L de la solución salina ajustada al pH óptimo de cada cepa BAL.
- f) Finalmente, se prosiguió el protocolo descrito en la sección 5.3.2.2 a partir del inciso d y hasta el g.
- g) Se colocaron controles: 250 μ L de cada una de las soluciones salinas con pH ajustado.

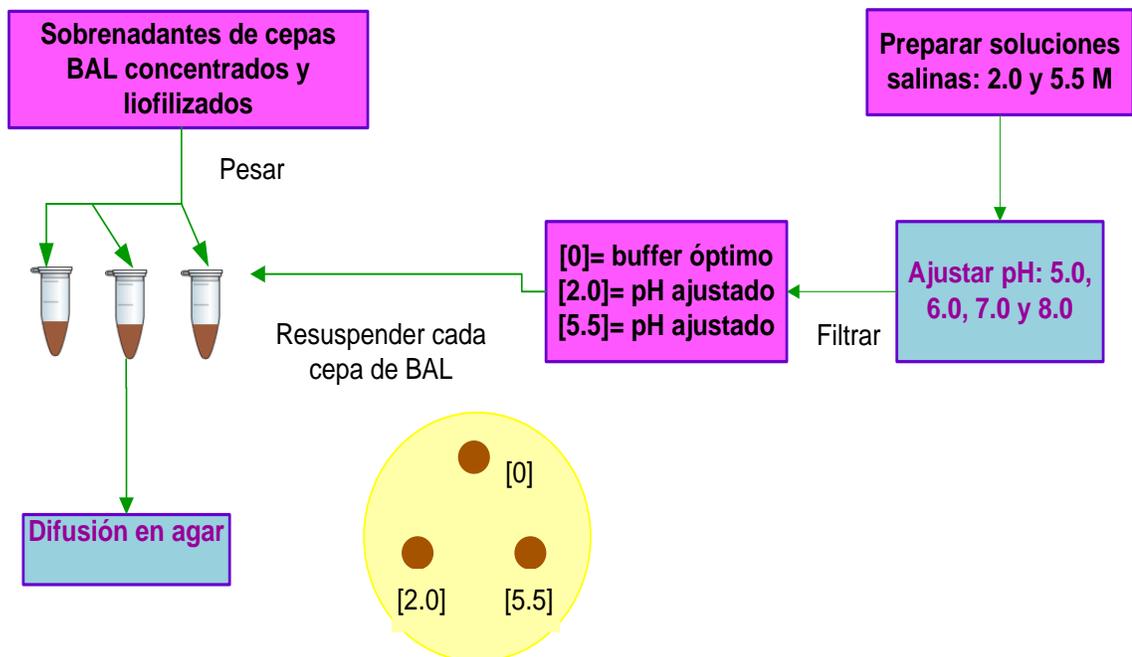


Figura 10. Efecto de la Fuerza Iónica ([NaCl]) sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas BAL aisladas del queso Cotija

5.4.4. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

5.4.4.1 Selección del pH óptimo de trabajo para cada BAL

Nuevamente se trabajo cada una de las cepas de BAL bajo las condiciones de pH óptimo con base en lo descrito en la sección 5.3.2.2.

5.4.4.2 Realización del ensayo (Figura 11)

- a) Se pesaron diez veces 500 mg de cada uno de los sobrenadantes de las cepas de BAL a probar, en tubos Eppendorf estériles de 2.0 mL.
- b) Las muestras se resuspendieron en 500 μ L del buffer óptimo para cada una de las cepas de BAL.
- c) Previo a la realización de la prueba difusión en agar, los sobrenadantes de cada cepa se sometieron a un calentamiento de acuerdo a las condiciones de incubación señaladas en la *Tabla 12*.

Tabla 12. Condiciones de incubación para el ensayo: Efecto de la Temperatura	
Cepas BAL (pH óptimo)	Condiciones de incubación
<i>L. paracasei</i> (pH 5.0)	4°, 10°, 20°, 30°, 37°C/ 20 min
<i>E. faecalis</i> (pH 8.0)	100°C/ 5 min
<i>L. brevis</i> (pH 7.0)	60°, 100°C y 120°C/ 20 min
<i>L. pentosus</i> (pH 6.0)	100°C/ 60 min

- d) Transcurrido el proceso de incubación, los sobrenadantes se enfriaron a temperatura ambiente y se prosiguió con el protocolo descrito en la sección 5.3.2.2 a partir del inciso d y hasta el g.

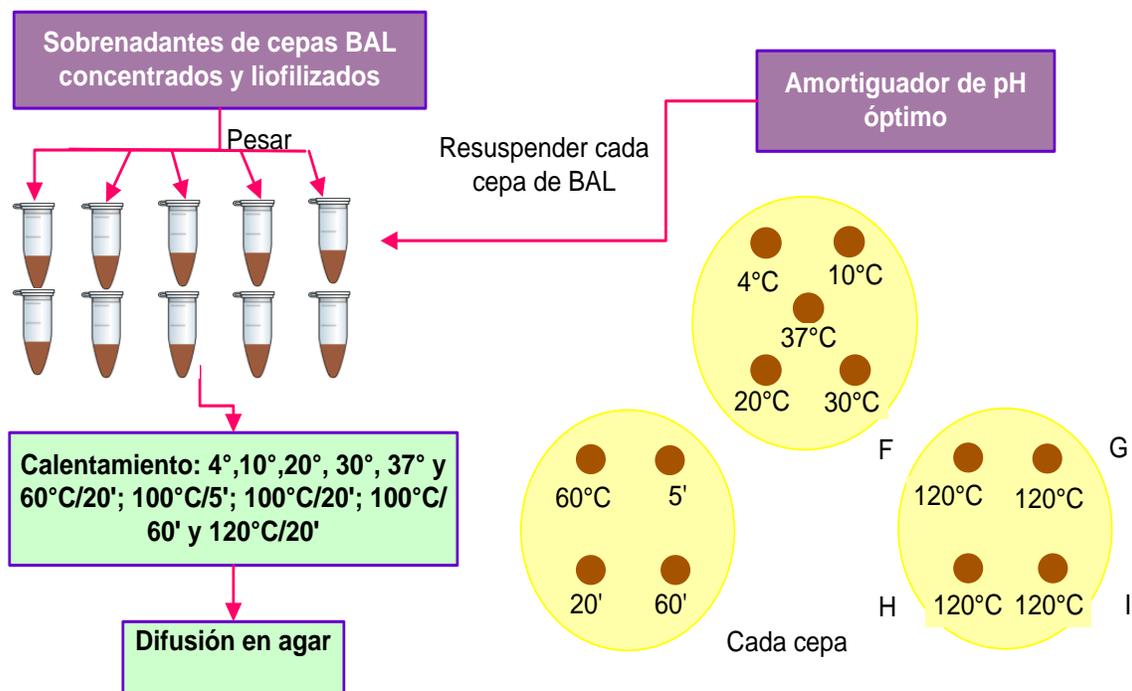


Figura 11. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de las cepas de BAL aisladas del queso Cotija

Para todos los ensayos anteriormente descritos la interpretación de resultados se determinó al medir los halos de inhibición obtenidos alrededor del pozo usando un Vernier.

Se definió la *Actividad Específica* como los mm de inhibición registrados alrededor del pozo por mg de proteína colocado en él, en una alícuota de 250 μ L de cada compuesto antibacteriano de las BAL provenientes del queso Cotija. Así mismo, considerando el mayor valor, los datos fueron normalizaron para calcular la actividad especifica relativa en términos porcentuales.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

Se verificó la pureza de todos los microorganismos empleados en la realización del trabajo, tanto de las cepas productoras de compuestos antibacterianos como de los diversos microorganismos indicadores. Se presentó crecimiento homogéneo de las colonias en medio sólido, se corroboró lo anterior también con una observación bajo el microscopio al realizar una tinción de Gram de cada uno de los microorganismos.

6.1 CÉSPED BACTERIANO

Esta técnica permitió elegir la dilución más apropiada para trabajar con cada uno de los microorganismos en estudio en la prueba presuntiva por difusión en agar, mediante la cual se observó el efecto antibacteriano de los sobrenadantes de las cepas BAL aisladas del queso Cotija. En la *Tabla 13* se presentan las diluciones que mostraron la mayor homogeneidad en el césped formado para cada microorganismo.

Cepa	Dilución seleccionada	Cepa	Dilución seleccionada
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	10 ⁻²	<i>Lactobacillus brevis</i>	10 ⁻¹
<i>Lactococcus lactis</i>	10 ⁻²	<i>Lactobacillus paracasei</i>	10 ⁻¹
<i>Listeria innocua</i>	10 ⁻¹	<i>Lactobacillus pentosus</i>	10 ⁻¹
<i>Micrococcus lysodeikticus</i>	10 ⁻³	<i>Enterococcus faecalis</i>	10 ⁻³
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	10 ⁻¹	<i>Enterococcus faecium</i>	10 ⁻¹
<i>Salmonella</i> serovar typhimurium	10 ⁻²	<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁻²
<i>Streptococcus sp.</i>	10 ⁻²		

6.2 PRUEBAS PRESUNTIVAS POR DIFUSIÓN EN AGAR

6.2.1 Selección de la fase de crecimiento óptima para la producción de compuestos antibacterianos por las cepas de BAL del queso Cotija.

Se analizó el efecto antagonista de los 9 sobrenadantes de las cepas BAL aisladas del queso Cotija en dos fases de crecimiento: logarítmica tardía y estacionaria temprana.

En el ensayo realizado no fue posible medir con precisión los halos de inhibición, dado que los halos obtenidos se juntaron y dificultaron la delimitación de cada uno. Debido a lo anterior, los resultados se muestran bajo una escala cualitativa de acuerdo al grado de inhibición observado.

El análisis consideró a todos los microorganismos listados en la *Tabla 13*; sin embargo, sólo se obtuvieron resultados positivos (presencia de halos de inhibición) al trabajar con los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Por lo anterior, en los siguientes apartados sólo se hará referencia a estos dos microorganismos indicadores.

Se tienen pocos reportes sobre la actividad bactericida de compuestos secretados por las BAL, como es el caso de las bacteriocinas, con acción frente a microorganismos Gram negativos. Por el contrario, la mayoría de las bacteriocinas conocidas y de sustancias con actividad bactericida (BLIS), presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de una gran diversidad de bacterias Gram positivas.

En un análisis exhaustivo realizado por el grupo de trabajo de Franz *et al.*, (1999) sobre el género *Enterococcus*, se describe el espectro de acción de las enterocinas frente a otros enterococos y microorganismos de importancia como *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens* y *C. tyrobutyricum*. De acuerdo con estos investigadores, la actividad anti-*Listeria* podría explicarse al tratarse de especies muy relacionadas filogenéticamente. Debido a lo anterior, proponen el empleo de dichas cepas con actividad bactericida principalmente en la industria láctea con el objeto de ser empleadas como agentes anti-*Listeria* particularmente durante la elaboración de quesos suaves como el Camembert y Taleggio donde se registra un incremento de pH sobre la corteza de los mismos que permite el desarrollo de *Listeria monocytogenes*.

Una aplicación de las enterocinas para inhibir el desarrollo de *L. monocytogenes* en quesos fue probado por Nuñez *et al.*, (1997) al inocular un queso Manchego con una bacteriocina producida por *E. faecalis* que disminuyó en 6 ciclos logarítmicos la población de este microorganismo patógeno en un período de 7 días.

Algunos reportes recientes, sugieren que algunas de las bacteriocinas secretadas por las BAL pueden contribuir con la inactivación de microorganismos Gram negativos presentes en los alimentos, si se aplican en combinación con agentes quelantes. En general, las bacterias Gram negativas no son sensibles a la nisina, sin embargo dicha sensibilidad no es compartida por la membrana citoplasmática, siendo el impedimento para llegar a ésta la membrana externa que estas bacterias poseen y que dificulta la acción de las bacteriocinas (Estrada *et al.*, 2006; Helander *et al.*, 1997; Stevens *et al.*, 1991).

La membrana externa de las bacterias Gram negativas presenta una composición diferente en su parte interna y externa. La parte interna, está constituida por glicerofosfolípidos, mientras que la externa se encuentra recubierta por lipopolisacáridos (LPS), estas moléculas se encuentran conformadas por un lípido y un complejo heteropolisacárido con comportamiento parcial aniónico, que en conjunto forman una capa dotada de una superficie hidrofóbica. Como consecuencia de lo anterior, la membrana externa impide el paso de sustancias hidrofóbicas y macromoléculas; como la Nisina®, una macromolécula hidrofóbica.

Dicha composición, les provee un mecanismo de protección ante la penetración de las bacteriocinas hacia la membrana citoplasmática (el sitio blanco); siendo uno de los factores importantes la presencia de los iones magnesio que estabilizan a los LPS que la conforman. Esta membrana a su vez impide el paso de antibióticos, detergentes y algunos colorantes hacia la membrana citoplasmática.

Stevens *et al.*, (1991) observaron que algunos agentes quelantes como el EDTA en combinación con condiciones estresantes tales como el calentamiento o la congelación pueden afectar la permeabilidad de la capa de LPS; conllevando a un incremento en la sensibilidad de varias especies de *Salmonella enterica* y otras bacterias Gram negativas frente a la Nisina®.

Así mismo, De Kwaadsteniet *et al.*, (2005) reportaron una bacteriocina aislada a partir de una planta procesadora de aceite de soya identificada como *E. mundtii* ST15, con actividad frente a microorganismos Gram negativos como *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *A. baumannii*; un comportamiento inusual que sólo ha sido identificado en otras bacteriocinas provenientes de BAL por otros grupos de investigación (plantaricina 35d de *L. plantarum*; bacteriocina ST151BR de *L. pentosus* ST151BR, el péptido AS-48 de *E. faecalis*).

6.2.1.1 Ensayo difusión en agar para *S. aureus*

En la *Tabla 14* y *Figura 12* se presentan los resultados obtenidos al trabajar con los sobrenadantes crudos (pH ajustado, filtrados, liofilizados y concentrados) de las nueve cepas de BAL.

Tabla 14. Ensayo difusión en agar para <i>S. aureus</i> ATCC6538			
Cepa	Nombre	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria
A	<i>E. faecalis</i>	-	+
B	<i>E. faecium</i>	+	-
C	<i>E. faecium</i>	-	-
D	<i>E. faecalis</i>	-	+
E	<i>E. faecium</i>	+	+
F	<i>L. paracasei</i>	+++	+++
G	<i>E. faecalis</i>	N.D.	+++++
H	<i>L. brevis</i>	++++	+++++
I	<i>L. pentosus</i>	++++	+++++

Notación:

(-) Significa que la prueba resultó negativa, no se observó actividad antibacteriana.

(+) La prueba difusión en agar es positiva, presencia de actividad antibacteriana; el número de signos esta relacionado con el grado de inhibición observado bajo una escala cualitativa.

N.D.= No Determinado.

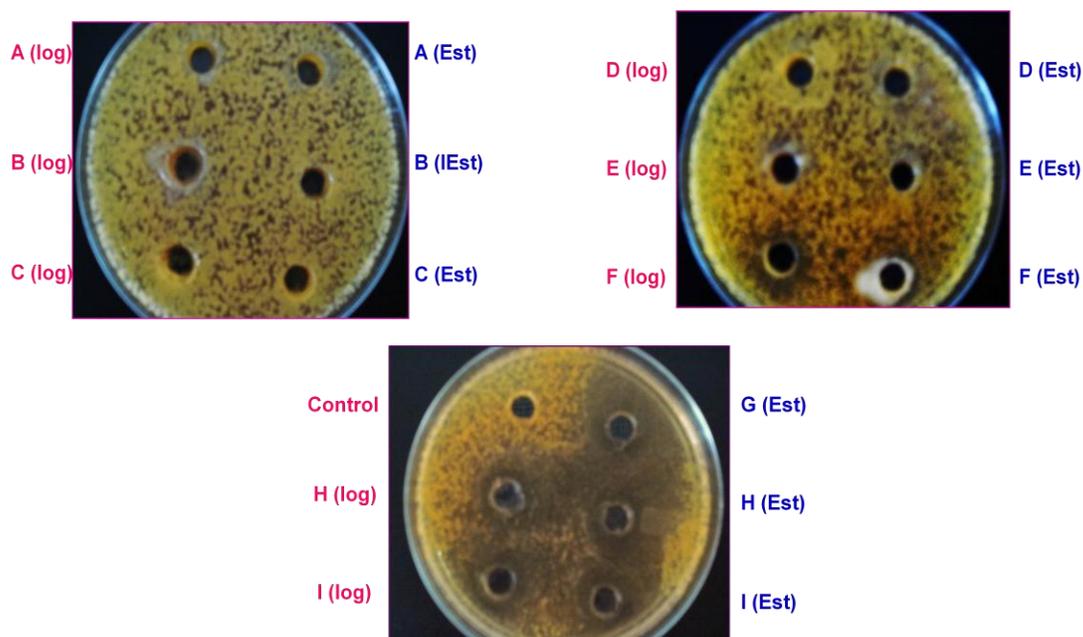


Figura 12. Actividad antibacteriana de las cepas de BAL sobre *S. aureus*. Izquierda: sobrenadantes fase logarítmica tardía; Derecha: Fase estacionaria temprana; Control: ausencia de sobrenadante.

6.2.1.2 Ensayo difusión en agar para *E. coli*

En la *Tabla 15* y *Figura 13* se muestran los resultados obtenidos al trabajar con los sobrenadantes crudos (pH ajustado, filtrados, liofilizados y concentrados) de las 9 cepas de BAL.

<i>Tabla 15. Ensayo difusión en agar para Escherichia coli DH5α</i>			
Cepa	Nombre	Fase Logarítmica	Fase Estacionaria
A	<i>E. faecalis</i>	+	+
B	<i>E. faecium</i>	+	+
C	<i>E. faecium</i>	+	+
D	<i>E. faecalis</i>	-	-
E	<i>E. faecium</i>	-	-
F	<i>L. paracasei</i>	+++++	+++++
G	<i>E. faecalis</i>	N. D.	+++++++
H	<i>L. brevis</i>	+++++	+++++++
I	<i>L. pentosus</i>	+++++	+++++++

Notación:

(-) Significa que la prueba resultó negativa, no se observó actividad antibacteriana.

(+) La prueba difusión en agar es positiva, presencia de actividad antibacteriana; el número de signos esta relacionado con el grado de inhibición observado bajo una escala cualitativa.

N.D. = No determinado

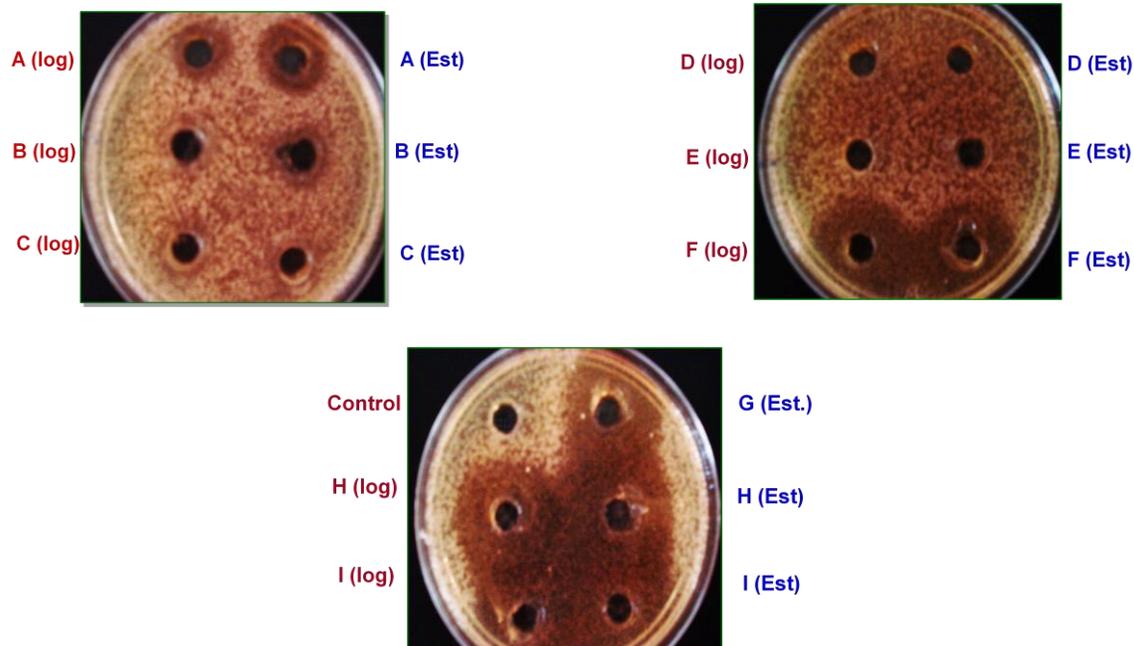


Figura 13. Actividad antibacteriana de las cepas de BAL sobre *E. coli*. Izquierda: sobrenadantes fase logarítmica tardía; Derecha: Fase estacionaria temprana; Control: ausencia de sobrenadante.

6.2.2 Determinación de proteína

En las *Tablas 16 y 17* se muestran las concentraciones de proteína de cada uno de los sobrenadantes crudos de las nueve BAL cosechadas y la cantidad de proteína colocada en cada uno de los pozos para observar el efecto bactericida anteriormente mostrado.

Tabla 16. Proteína contenida en los sobrenadantes de las cepas de BAL Fase Logarítmica Tardía

Cepa	Nombre	[Proteína] µg/mL	Proteína por pozo (µg)
A	<i>E. faecalis</i>	470	94.0
B	<i>E. faecium</i>	679	135.8
C	<i>E. faecium</i>	656	131.2
D	<i>E. faecalis</i>	753	150.6
E	<i>E. faecium</i>	435	87.0
F	<i>L. paracasei</i>	708	141.6
H	<i>L. brevis</i>	918	183.6
I	<i>L. pentosus</i>	986	197.2

Tabla 17. Proteína contenida en los sobrenadantes de las cepas BAL Fase Estacionaria Temprana			
Cepa	Nombre	[Proteína] $\mu\text{g/mL}$	Proteína por pozo (μg)
A	<i>E. faecalis</i>	407	81.4
B	<i>E. faecium</i>	516	103.2
C	<i>E. faecium</i>	757	151.4
D	<i>E. faecalis</i>	631	126.2
E	<i>E. faecium</i>	959	191.8
F	<i>L. paracasei</i>	953	190.6
G	<i>E. faecalis</i>	574	114.8
H	<i>L. brevis</i>	701	140.2
I	<i>L. pentosus</i>	759	151.8

Los resultados de la técnica difusión en agar para cada microorganismo indicador, muestran que el mayor grado de inhibición se obtiene trabajando con los sobrenadantes obtenidos en la fase estacionaria de crecimiento. Es importante destacar que el comportamiento observado pone de manifiesto que aún cuando la cantidad de proteína colocada en cada pozo puede ser muy similar (considerando ambas fases de crecimiento ensayadas), no se registra un grado de inhibición correspondiente. El efecto observado, podría corresponder con la naturaleza de la sustancia presente.

Por ejemplo, tomando de la *Tabla 16* los datos de proteína por pozo de las cepas B y C (género *Enterococcus*) con 135.8 y 131.1 μg respectivamente, pese a presentar valores de proteína en magnitud muy similar al registrado por la cepa F (género *Lactobacillus*) con 141.6 μg ; muestran un grado de inhibición bajo e incluso nulo frente a *S. aureus* y *E. coli*, comportamiento que no se observa con la cepa perteneciente al género *Lactobacillus* (ver Figuras 12 y 13).

De igual forma, considerando los resultados mostrados en la *Tabla 17* y efectuando un comparativo entre la cepa C (*Enterococcus*) e I (*Lactobacillus*) que poseen 151.4 y 151.8 μg de proteína por pozo respectivamente, se muestra nuevamente que la cantidad de proteína no determina directamente el grado de inhibición observado frente a los microorganismos *S. aureus* y *E. coli* (ver Figuras 12 y 13).

En las *Tablas 14 y 15* se muestra un incremento en la actividad antibacteriana de los compuestos extracelulares de las cepas de BAL obtenidos durante la fase estacionaria de crecimiento. Considerando estos resultados preliminares se decidió trabajar únicamente con los sobrenadantes de las cepas BAL cosechados durante la Fase Estacionaria Temprana.

6.2.3 Efecto de los compuestos antibacterianos en la fase óptima de crecimiento

Como se mencionó en la sección de metodología, en estos ensayos se colocaron controles de enzimas que se sabe ejercen acción inhibitoria sobre el crecimiento de algunos de los microorganismos indicadores. Así mismo, se incluyeron los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las cepas BAL como controles, con la finalidad de descartar el posible efecto bactericida que pudieran presentar sobre los microorganismos en estudio.

6.2.3.1 Actividad antibacteriana de los compuestos antibacterianos de BAL sobre *S. aureus*

Se logró observar el efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus*, destacándose la acción inhibitoria por parte de las cepas BAL pertenecientes al género *Lactobacillus*. La *Figura 14 y Tabla 18* muestran los resultados obtenidos.

Como se puede observar, únicamente los compuestos extracelulares pertenecientes a la cepa G del género *Enterococcus* y las tres cepas del género *Lactobacillus* registraron una buena actividad antibacteriana sobre *S. aureus*; todas ellas cultivadas en medio MRS. Las cepas restantes del género *Enterococcus* que se cultivan en medio APT no mostraron actividad antibacteriana frente a este microorganismo indicador.

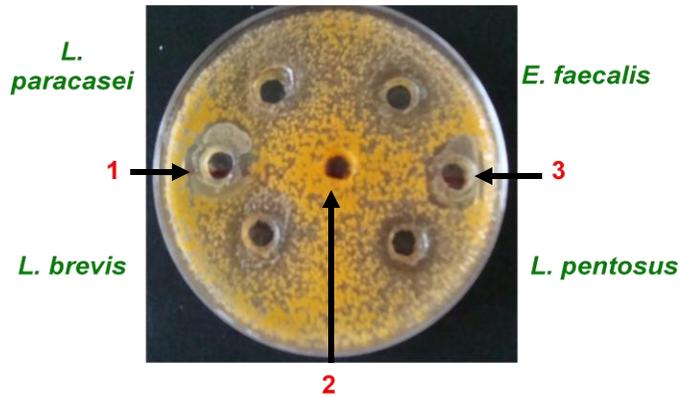


Figura 14. Efecto antibacteriano de los compuestos extracelulares de BAL sobre *S. aureus*. Controles: (1) Lisostafina [0.1mg/ml], (2) Lisozima [0.1 mg/ml]; (3) Nisaplin® [0.5mg/ml].

Tabla 18. Actividad antibacteriana de los compuestos extracelulares de las BAL sobre <i>S. aureus</i>				
Cepa	Nombre	mm inhibición	Proteína por pozo (mg)	Actividad Específica (mm inh./mg prot.)
A	<i>E. faecalis</i>	----	0.148	----
B	<i>E. faecium</i>	----	0.178	----
C	<i>E. faecium</i>	----	0.158	----
D	<i>E. faecalis</i>	----	0.145	----
E	<i>E. faecium</i>	----	0.190	----
F	<i>L. paracasei</i>	15	0.181	82.9
G	<i>E. faecalis</i>	17	0.214	79.4
H	<i>L. brevis</i>	23	0.186	123.6
I	<i>L. pentosus</i>	22	0.215	102.3
	Medio MRS	----	0.133	----
	Medio APT	----	0.084	----

El efecto de las enzimas comerciales colocadas como controles concuerda con el comportamiento que se esperaba observar, es decir; tanto la lisostafina como el Nisaplin® (bacteriocina) inhiben el crecimiento de *S. aureus* al dañar la pared celular de esta bacteria. Por el contrario, la lisozima no presenta actividad antibacteriana sobre *S. aureus* y no hay evidencia de inhibición en su crecimiento alrededor del pozo donde la enzima fue colocada.

En la *Figura 15* se muestra que no se presentó efecto inhibitorio por parte de los medios de cultivo MRS y APT colocados como controles; lo anterior permite descartar que la actividad antibacteriana registrada por las cepas de BAL aisladas del queso Cotija se

deba a algún componente presente en los mismos; por lo cual dicho comportamiento se atribuye por completo a los compuestos extracelulares generados por estas cepas.

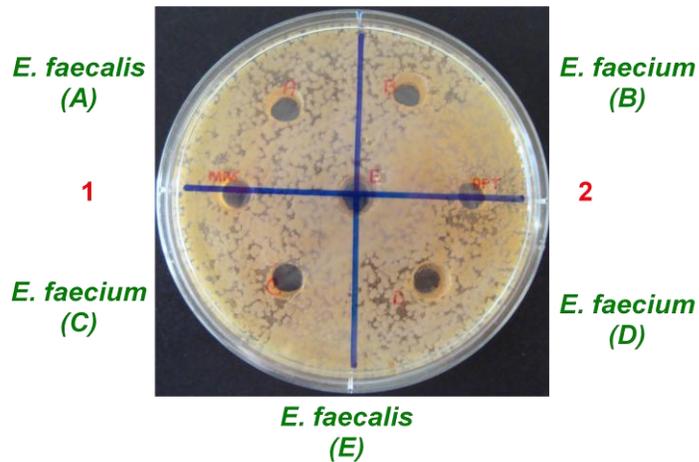


Figura 15. Efecto antibacteriano de los compuestos extracelulares de BAL sobre *S. aureus*.
Controles: (1) medio MRS, (2) medio APT.

6.2.3.2 Actividad antibacteriana de los compuestos extracelulares de BAL sobre *E. coli*

Al igual que en el ensayo anterior, se evaluó el efecto antibacteriano sobre *E. coli*. La *Figura 16* muestra el comportamiento registrado por los compuestos extracelulares de las cepas de BAL. No fue posible determinar con exactitud los halos de inhibición presentados, por poseer un diámetro muy grande.

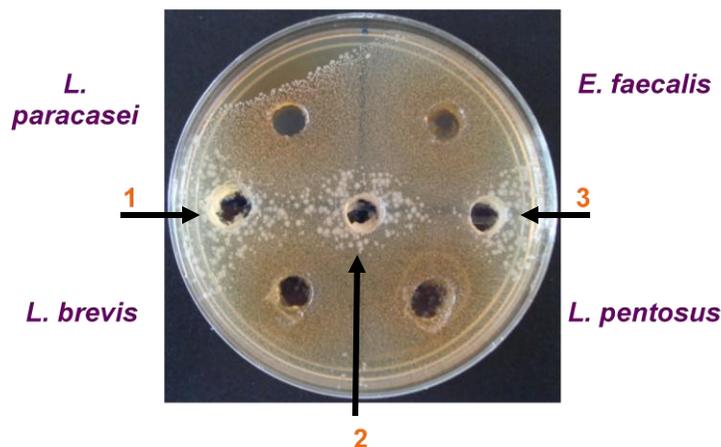


Figura 16. Efecto antibacteriano de los compuestos extracelulares de BAL sobre *E. coli*. Controles: (1) Lisostafina [0.1mg/ml], (2) Lisozima [0.1 mg/ml]; (3) Nisaplin © [0.5mg/ml].

En lo que respecta al efecto de las enzimas comerciales colocadas como controles, la lisostafina y el Nisaplin® (bacteriocina) no inhiben el crecimiento de *E. coli* dado que no ejercen daño alguno sobre la pared celular de esta bacteria. Por su parte, aunque en la figura anterior pareciera que la enzima lisozima presenta actividad antibacteriana frente a *E. coli*, el efecto observado se debe a la difusión del compuesto antibacteriano presente en los sobrenadantes crudos de las cepas de *E. faecalis* y *L. pentosus* respectivamente, y no a una acción lítica de dicha enzima sobre el microorganismo en estudio.

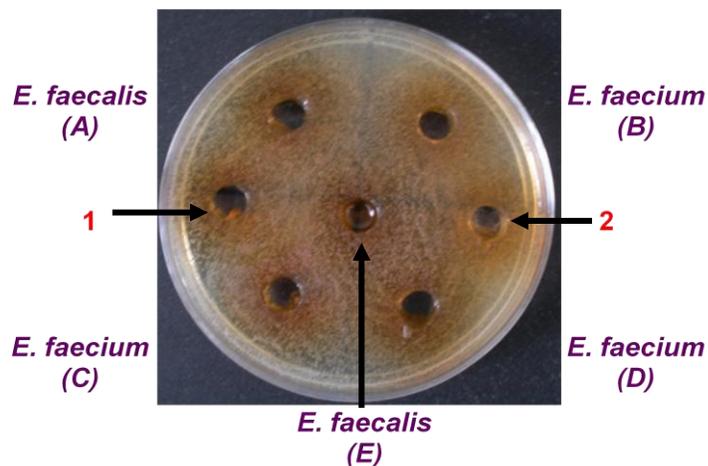


Figura 17. Efecto antibacteriano de los compuestos extracelulares de BAL sobre *E. coli*
Controles: (1) medio MRS, (2) medio APT.

Nuevamente se demuestra que no existe efecto inhibitorio por parte de los medios de cultivo MRS y APT colocados como controles (*Figura 17*). Lo anterior permite atribuir el comportamiento observado únicamente a los compuestos extracelulares producidos por las cepas de BAL aisladas del queso Cotija y descartar que la actividad antibacteriana registrada se deba a algún componente presente en los mismos.

De acuerdo a los resultados presentados, el efecto antibacteriano por parte de los sobrenadantes de las nueve cepas BAL aisladas del queso Cotija, únicamente se logró observar al emplear a *E. coli* y *S. aureus* como microorganismos indicadores.

Cabe destacar que en ambos casos el mayor efecto inhibitorio se obtuvo al emplear los sobrenadantes del género *Lactobacillus*, los cuales presentaron una concentración de

proteína durante la fase estacionaria temprana considerable que les permitió registrar una mayor actividad antagonista frente al crecimiento de los microorganismos indicadores.

Se tienen antecedentes respecto a compuestos de origen proteínico (bacteriocinas) producidos por las BAL que presentan la capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y algunas de ellas incluso poseen actividad contra microorganismos patógenos y causantes de la descomposición en los alimentos, especies como son: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otras (De Vuyst & Vandamme, 1999b).

En lo que respecta a las cepas del género *Enterococcus*, la cepa G (*E. faecalis*) que a diferencia de las otras cinco cepas se cultivó en medio MRS, presentó la mayor actividad sobre *S. aureus* y *E. coli*. El hecho de que se haya cultivado en este medio parece que puede tener un efecto directo en la producción de proteínas extracelulares, por lo cual se observó una actividad antibacteriana mayor, en comparación con las otras cepas del mismo género cultivadas en medio APT. Dicho comportamiento en cepas de *Enterococcus* ya ha sido observado por algunos investigadores, quienes probaron diversos medios usados para el crecimiento y producción de sustancias con actividad bactericida por parte de las BAL y encontraron que el medio MRS es el óptimo para lograr una mayor producción de compuestos con naturaleza antibacteriana, debido a que les provee los requerimientos necesarios como la fuente de nitrógeno, carbohidratos y cofactores que estimulan su producción (Settanni *et al.*, 2008).

De manera general se puede establecer que hay presencia de actividad antibacteriana en algunas de las cepas aisladas a partir del queso Cotija. Sin embargo, no es el mismo comportamiento que se registra en las cepas A (*E. faecalis*), B (*E. faecium*) y C (*E. faecium*), quienes poseen una actividad antibacteriana mucho menor en comparación de la presentada por las cepas de *Lactobacillus* y la cepa G de *Enterococcus*, por lo que se podría sugerir que estos microorganismos podrían

contribuir en menor medida en la disminución de la carga microbiana del queso Cotija a lo largo del período de maduración.

Con respecto al espectro de susceptibilidad bacteriana que se esperaba al trabajar en mayor medida con microorganismos Gram positivos y sólo dos cepas Gram negativas, *E. coli* DH5 α y *Salmonella* serovar thyphimurium. Los resultados permiten inferir que las sustancias que están generando el efecto inhibitorio provenientes de las BAL del queso Cotija, lo hacen principalmente sobre *E. coli* DH5 α .

Como se definió previamente, una de las principales características de las bacteriocinas es el espectro de acción que tiene sobre las bacterias Gram positivas y las que se encuentran relacionadas filogenéticamente con la cepa productora; sin embargo dados los resultados preliminares, por el momento no se pudo establecer que la acción antibacteriana registrada se deba a la producción de este tipo de compuestos por las BAL aisladas del queso Cotija y que forman parte esencial de la microbiota que se desarrolla a lo largo del proceso de elaboración y maduración del mismo.

Finalmente lo que es destacable de los resultados, es la acción antibacteriana que se logró observar contra dos de los microorganismos indeseables que comúnmente se encuentran presentes en diversos alimentos, *E. coli* y *S. aureus*, ya que su presencia representa un riesgo importante en la salud de los consumidores.

Estrada, C. (2009) al efectuar un análisis microbiológico de 10 muestras de queso Cotija de la región productora, logró detectar la presencia de *S. aureus* en tres de las muestras analizadas, *Salmonella typhi* en dos de ellas y a *E. coli*, sin embargo las diluciones en las que se logró detectar la presencia de cada uno de estos microorganismos (10^{-3}) no fueron consideradas estadísticamente relevantes; y en ninguno de los casos se sobrepasó el límite establecido por la normatividad mexicana.

6.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL

A continuación se presentan los datos más representativos del comportamiento observado para cada una de las BAL del queso Cotija, esto es, en imágenes fotográficas donde se pueden observar los halos de inhibición que registró el sobrenadante crudo de cada una frente a los dos microorganismos indicadores empleados: *S. aureus* y *E. coli* respectivamente; así como también un gráfico donde se puede observar y comparar la actividad específica relativa (%) con base en los ensayos realizados. Se efectuaron tres ensayos para cada uno de los parámetros a caracterizar, cabe mencionar que se presentó una gran variabilidad entre los mismos debido a los diversos cultivos líquidos que se necesitaron para la realización de los ensayos.

6.3.1 EFECTO DEL pH SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

Las *Figuras 18* y *19* representan el control de los amortiguadores de pH empleados con cada una de las BAL. Estos se probaron con los dos microorganismos indicadores para determinar su posible contribución al efecto inhibitorio observado.

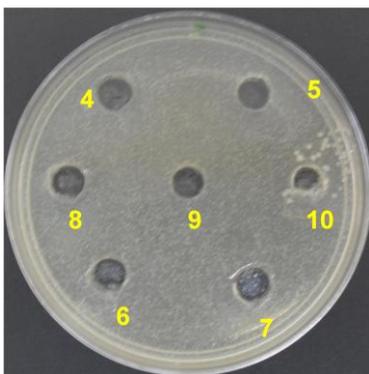


Figura 18. Controles de pH frente a *E. coli*

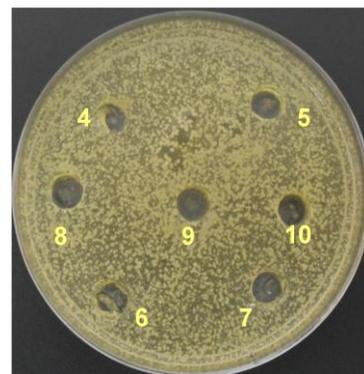


Figura 19. Controles de pH frente a *S. aureus*

Como se muestra en las figuras, ninguno de los amortiguadores de pH ajustados ejerció por sí solo efecto inhibitorio sobre los microorganismos indicadores *S. aureus* y *E. coli*; de manera que los resultados que se presentan en los apartados siguientes el efecto antibacteriano corresponde únicamente al aportado por cada BAL sometida a los diferentes valores de pH.

6.3.1.1 Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus paracasei*

En las Figuras 20 y 21, se muestran los halos de inhibición obtenidos al trabajar con el sobrenadante (SN) de *L. paracasei* en el intervalo de pH de 4.0 a 10.0 (con incrementos de una unidad) empleando a *S. aureus* y *E. coli* como microorganismos indicadores respectivamente.

Cabe señalar que aún cuando se presenta una elevada actividad antibacteriana al trabajar a pH 4.0 y 6.0, la mayor actividad inhibitoria, se registró a un pH de 5.0 (Figura 22) y un decremento en la misma a valores superiores de pH 7.0; principalmente al usar a *E. coli* como microorganismo indicador. Sin embargo, aún a pH 9.0 se presenta una actividad superior al 50%. Dicho comportamiento es característico de las BAL y ha sido reportado por diversos investigadores (De Vuyst & Vandamme, 1994b).

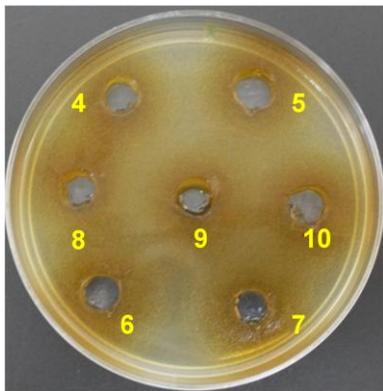


Figura 20. Efecto del pH: SN de *L. paracasei* frente a *E. coli*

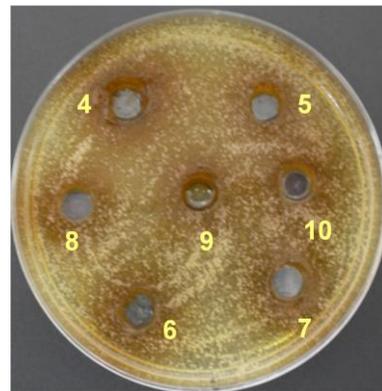


Figura 21. Efecto del pH: SN de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

En lo que respecta a *S. aureus*, se observó que la disminución en la actividad inhibitoria se da en menor proporción a la registrada con *E. coli*. Lo anterior muestra que la actividad antibacteriana sobre ambos microorganismos se observa en un amplio intervalo de pH. Estos resultados indican que los compuestos antibacterianos extracelulares secretados por *L. paracasei* se podrían emplear como conservadores no sólo del queso Cotija sino de otro tipo de productos alimenticios.

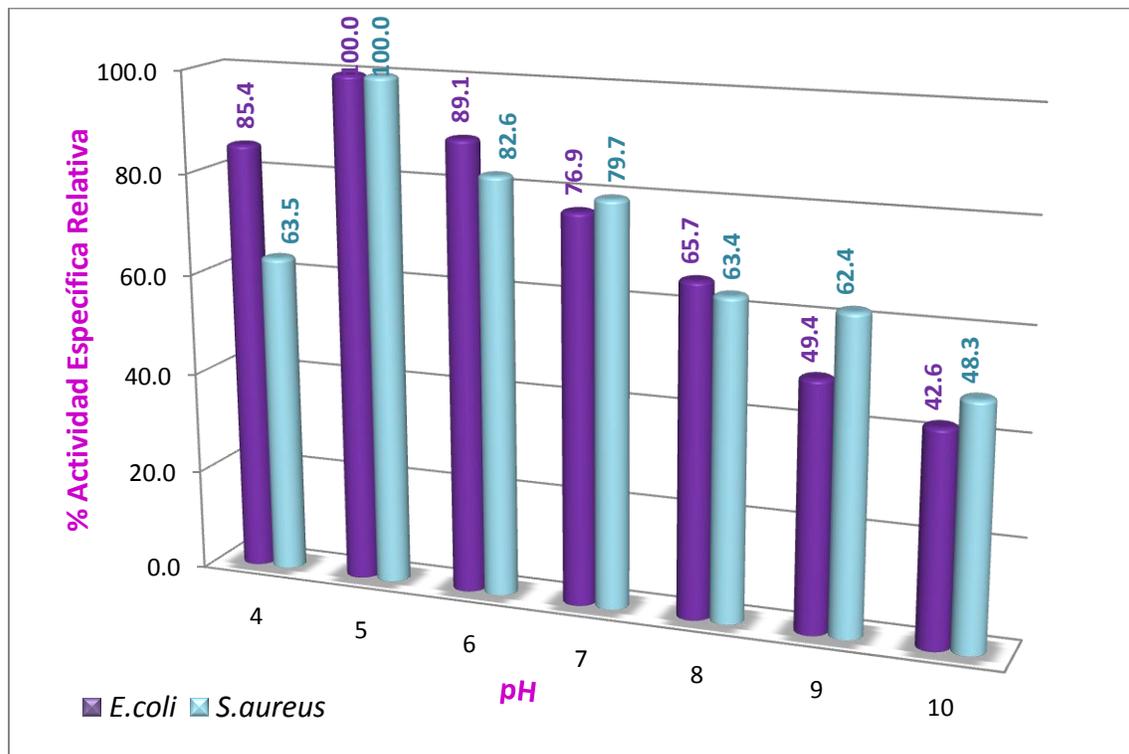


Figura 22. Gráfico comparativo del efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes (SN) de *L. paracasei* frente a los microorganismos indicadores: *E. coli* y *S. aureus*.

6.3.1.2 Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Enterococcus faecalis*

Las Figuras 23 y 24 muestran el efecto inhibitorio que se obtuvo al trabajar con *E. faecalis* sobre los dos microorganismos indicadores: *S. aureus* y *E. coli*.

En las mismas, se puede apreciar que *E. faecalis* tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de estos microorganismos de importancia en salud a valores de pH ácidos pero también a pH cercanos a la neutralidad (pH 7.0 y 8.0), esta característica permitiría su aplicación como bioconservador en alimentos con pH ácidos como es el caso del queso Cotija; pero también en aquellos que presenten un valor de pH muy cercano a la neutralidad.

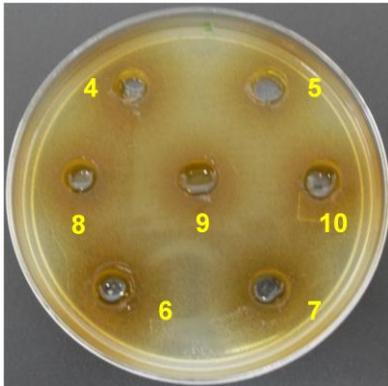


Figura 23. Efecto del pH: SN de *E. faecalis* frente a *E. coli*

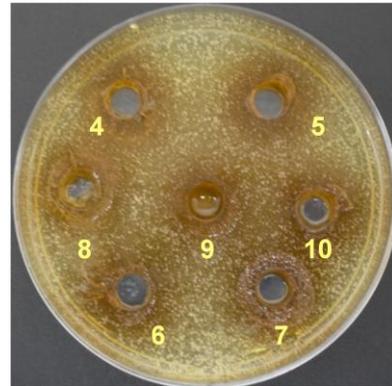


Figura 24. Efecto del pH: SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

Es importante señalar que aún cuando no se presenta una tendencia en la actividad antibacteriana, como en el caso de la cepa de *L. paracasei*, el pH al que se registró la mayor actividad inhibitoria fue de 8.0 sobre ambos microorganismos indicadores (*Figura 25*).

Sin embargo, el efecto del pH sobre la actividad de los sobrenadantes crudos obtenidos de *E. faecalis* presenta diferencias dependiendo del microorganismo indicador empleado. De esta manera se observa que sobre *S. aureus* la actividad inhibitoria a pH ácidos se va incrementando poco a poco, comenzando en un 73% (pH 4.0) hasta llegar a pH 6.0 donde registra una actividad de 88.3%, con una disminución mínima a pH 7.0 y alcanzar la máxima actividad en pH 8.0, para nuevamente decrecer, sin llegar a perder el 50% de actividad, aún a pH 10.0.

Contra *E. coli*, el comportamiento de la actividad antibacteriana es diferente; comienza con 66.3% (pH 4.0) alcanzando un valor mínimo de 45.3% a pH 7.0, es decir una pérdida de actividad por debajo del 50%. Cuando se trabaja a pH 8.0 la actividad inhibitoria llega a su máximo y nuevamente comienza un decremento pero sin llegar nuevamente a perderse más del 50% de su actividad.

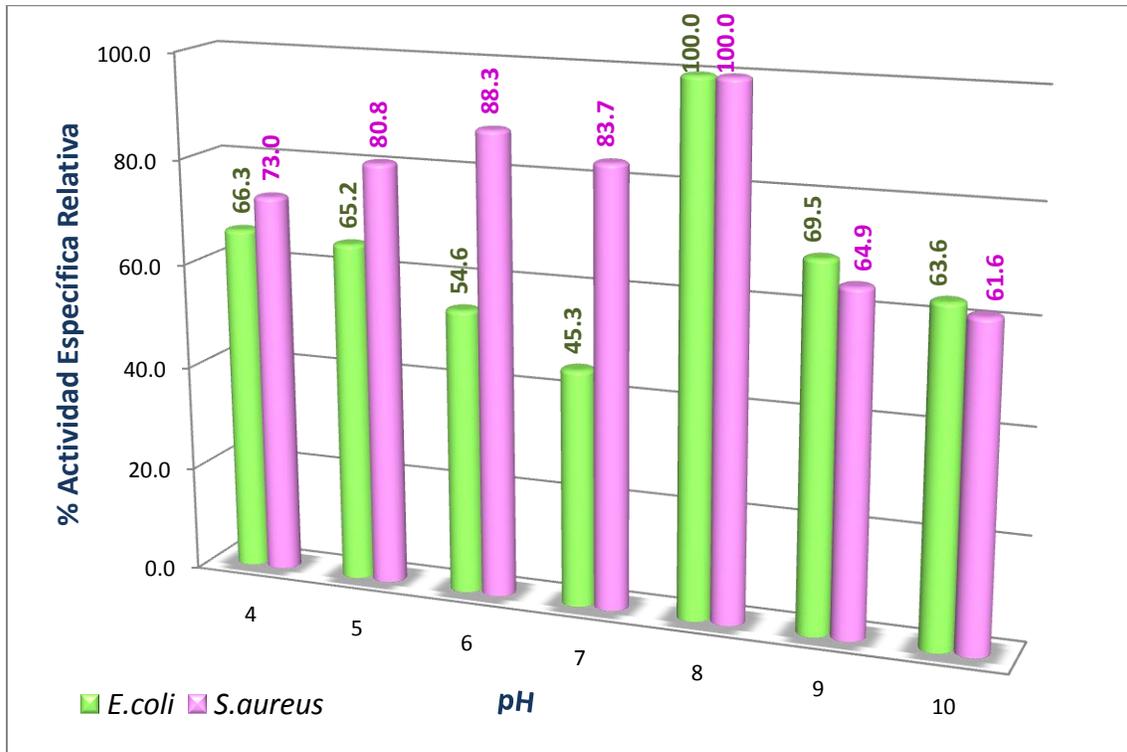


Figura 25. Gráfico comparativo del efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a los microorganismos indicadores: *E. coli* y *S. aureus*.

Lo anterior pudiera sugerir un comportamiento diferencial por parte de *E. faecalis* dependiendo del microorganismo indicador empleado, ya que como se describió, al trabajar sobre *S. aureus* se registra una mayor actividad antibacteriana a valores de pH ácidos, con un máximo en pH 8.0. Sin embargo, para *E. coli* la mayor actividad inhibitoria se observó trabajando en los extremos del intervalo de pH seleccionado donde sobrepaso el 50%, siendo máxima a pH 8.0 y mínima en las dos unidades inferiores a este valor.

Con base en lo anterior, nuevamente se podría establecer la contribución de esta cepa de BAL a la inocuidad del queso Cotija, dado que ejerce un efecto antibacteriano sobre ambos microorganismos de importancia en salud y presenta estabilidad dentro de los intervalos de pH utilizados.

6.3.1.3 Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus brevis*

En las *Figuras 26 y 27* se puede apreciar la actividad inhibitoria que los sobrenadantes de *L. brevis* ejercen sobre *S. aureus* y *E. coli*, respectivamente. Como se puede observar esta BAL tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de ambos microorganismos a pH entre 4.0 y 8.0.

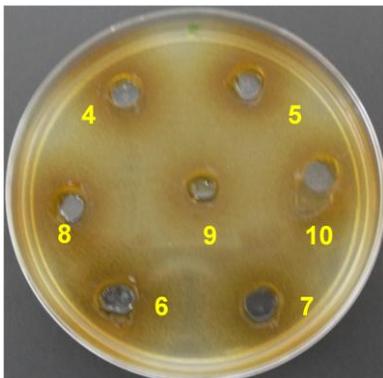


Figura 26. Efecto del pH: SN de *L. brevis* frente a *E. coli*



Figura 27. Efecto del pH: SN de *L. brevis* frente a *S. aureus*

Por otra parte, en la *Figura 28* se puede analizar el comportamiento que la cepa de *L. brevis* presentó frente a ambos microorganismos indicadores. Como se observa es muy semejante la tendencia a inhibir el desarrollo de los dos microorganismos, comienza con un incremento (excepto para *E. coli* que presenta una actividad alta desde pH 4.0) para llegar a un máximo (pH 7.0) y posteriormente declina sin perder más del 50% de su actividad.

Cabe destacar que la actividad sobre *S. aureus* comienza a declinar de forma considerable a pH alcalinos a diferencia de *E. coli* cuya disminución no es tan marcada. Sin embargo en ambos casos se logró observar un efecto antibacteriano que demuestra la capacidad que tiene esta BAL aislada del queso Cotija para producir compuestos con acción antibacteriana que contribuyen con la inocuidad del producto.

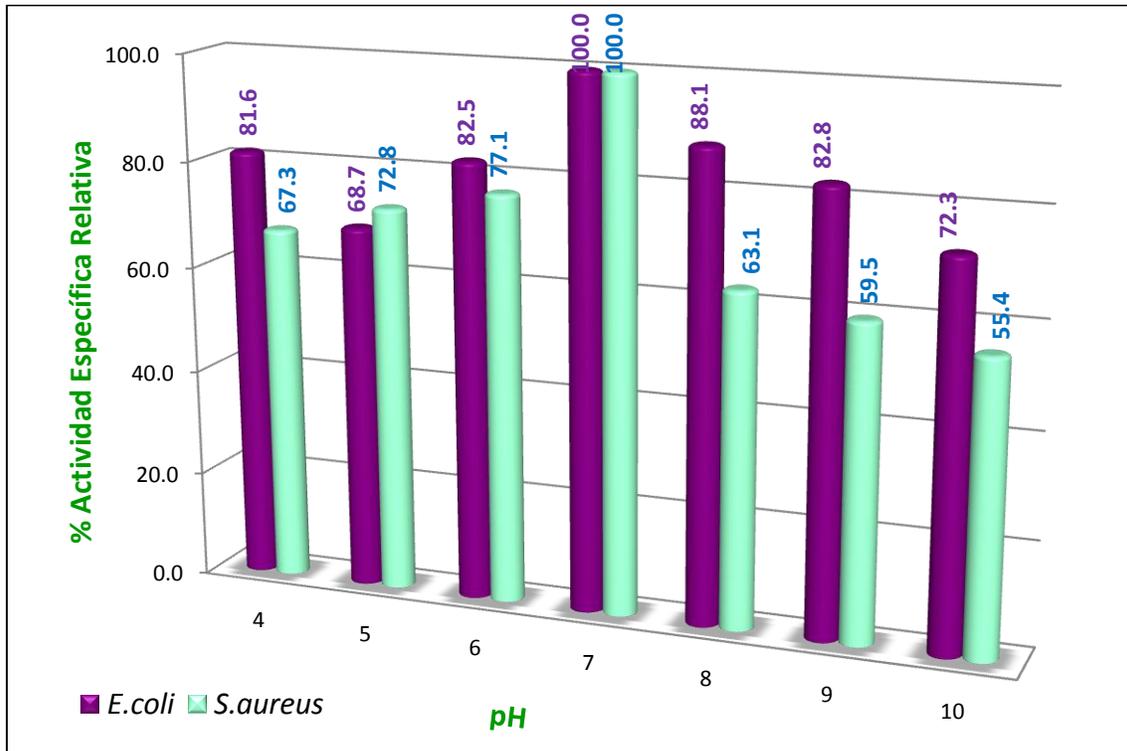


Figura 28. Gráfico comparativo del efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. brevis* frente a los microorganismos indicadores: *E. coli* y *S. aureus*.

6.3.1.4 Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus pentosus*

El comportamiento que esta cepa presentó frente a cada uno de los microorganismos indicadores a los diferentes valores de pH trabajados se muestra en las Figuras 29 y

30. Se observa que la actividad antibacteriana es mayor al trabajar a pH por debajo de 7.0.

Así mismo en la *Figura 31* se ilustra con mayor claridad el comportamiento antes descrito, y se puede observar que el efecto que *L. pentosus* presenta frente a *E. coli* es muy similar al registrado con la cepa de *L. brevis*; esto es, inicia con una actividad inhibitoria elevada (pH 4.0) seguido de un ligero decaimiento y posteriormente un incremento gradual culminando en un máximo a pH 6.0.

Conforme se va alejando del pH ideal, la pérdida de actividad antibacteriana sobre este microorganismo indicador se va incrementando llegando incluso a la mitad de la actividad máxima registrada.

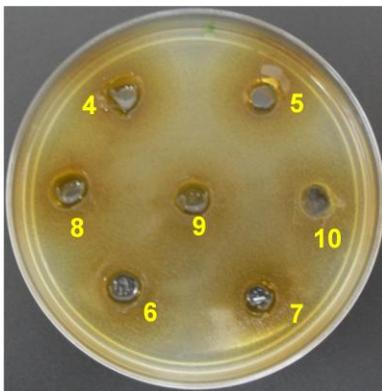


Figura 29. Efecto del pH: SN de *L. pentosus* frente a *E. coli*

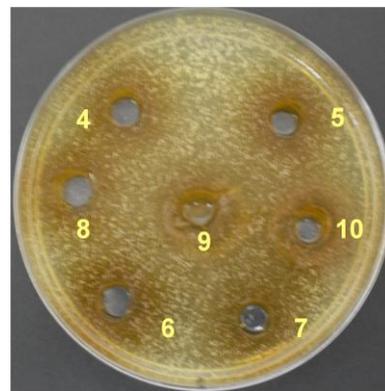


Figura 30. Efecto del pH: SN de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

Para *S. aureus* se puede observar que la actividad inhibitoria va en incremento y a pH de 6.0 se consigue la mayor actividad, como en el caso descrito para *E. coli*, y posteriormente comienza a disminuir la efectividad de los SN de *L. pentosus* para inhibir el crecimiento de *S. aureus*.

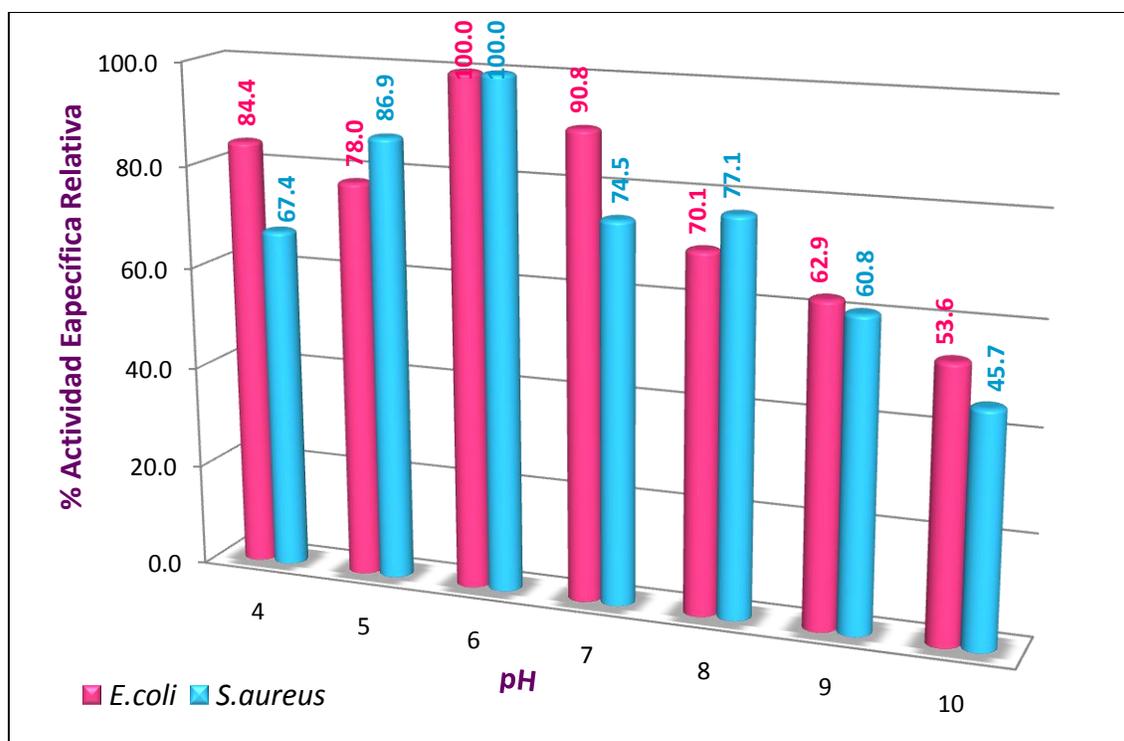


Figura 31. Gráfico comparativo del efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. pentosus* frente los microorganismos indicadores: *E. coli* y *S. aureus*.

Con base en los resultados presentados anteriormente se puede establecer que el pH óptimo para cada una de las cepas de BAL es el siguiente:

Tabla 14. Selección del pH óptimo para las cepas de BAL aisladas del queso Cotija	
Cepa BAL	pH óptimo
<i>Lactobacillus paracasei</i>	5.0
<i>Enterococcus faecalis</i>	8.0
<i>Lactobacillus brevis</i>	7.0
<i>Lactobacillus pentosus</i>	6.0

De acuerdo con ella, se puede establecer que al menos dos de las cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* presentan una actividad antibacteriana mayor a pH ácido sobre *S. aureus* y *E. coli*, la cual decrece conforme se incrementa el valor de

pH hasta llegar a perder en algunos casos la mitad de la actividad que se observó bajo el pH óptimo de trabajo.

Por su parte las cepas *L. brevis* y *E. faecalis* mostraron una preferencia para trabajar inhibiendo el desarrollo de los dos microorganismos indicadores a pH 7.0 y 8.0 respectivamente. Este comportamiento es poco común para la gran mayoría de las BAL que se tiene conocimiento son productoras de compuestos antibacterianos (De Vuyst & Vandamme, 1994b).

Finalmente, el ensayo permitió determinar bajo que condición de pH se conseguía el mayor efecto inhibitorio sobre ambos microorganismos indicadores y proseguir con la caracterización individual de las cepas manteniendo este parámetro identificado constante a lo largo de los demás ensayos.

En función de los resultados antes presentados y los mostrados en el *Anexo II*, se puede establecer que las BAL caracterizadas en función del pH podrían contribuir considerablemente con la inocuidad observada en el queso Cotija.

Como ya ha sido mencionado el pH del producto madurado se encuentra dentro de los valores de 4.8 a 5.2, debido a lo cual la actividad antibacteriana observada en los compuestos extracelulares producidos por las BAL, puede tener un papel importante en la inocuidad del mismo.

6.3.2 EFECTO DE LA FUERZA IÓNICA ([NaCl]) SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL DEL QUESO COTIJA

Como ya se describió en la sección 5.3.3.1 para este ensayo las soluciones salinas empleadas fueron ajustadas con base en el pH óptimo para cada una de las BAL bajo el cual se logró observar el máximo de actividad antibacteriana frente a los microorganismos indicadores *S. aureus* y *E. coli*.

Las concentraciones de sal ensayadas fueron escogidas con base en la proporción de sal presente en los quesos clasificados como poco salados y aquellos que presentan en su composición una mayor cantidad de sal. El queso Cotija es un producto que se caracteriza por la alta concentración de sal que se emplea para su elaboración y maduración, de acuerdo con los parámetros fisicoquímicos establecidos en el Anteproyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009, posee aproximadamente un 3.4 % de sal. Debido a lo anterior, también las concentraciones de sal seleccionadas para caracterizar los compuestos antibacterianos secretados por las BAL aisladas del queso Cotija, asemejan las condiciones salinas a las que se encuentran dichas BAL en su entorno natural.

Es importante mencionar que cada una de estas soluciones salinas ajustadas al pH óptimo, fueron probadas como controles frente los mismos microorganismos indicadores que se han empleado en esta caracterización, con ello se pretendía identificar la posible contribución de estos iones con la actividad antibacteriana registrada para cada cepa de BAL.

Sin embargo, ninguna de estas soluciones ejerció efecto inhibitorio de manera que las actividades observadas en los apartados siguientes se debe únicamente a la producción de compuestos antibacterianos provenientes de los sobrenadantes crudos de las BAL aisladas del queso Cotija que se están caracterizando (*Figuras 32 y 33*).

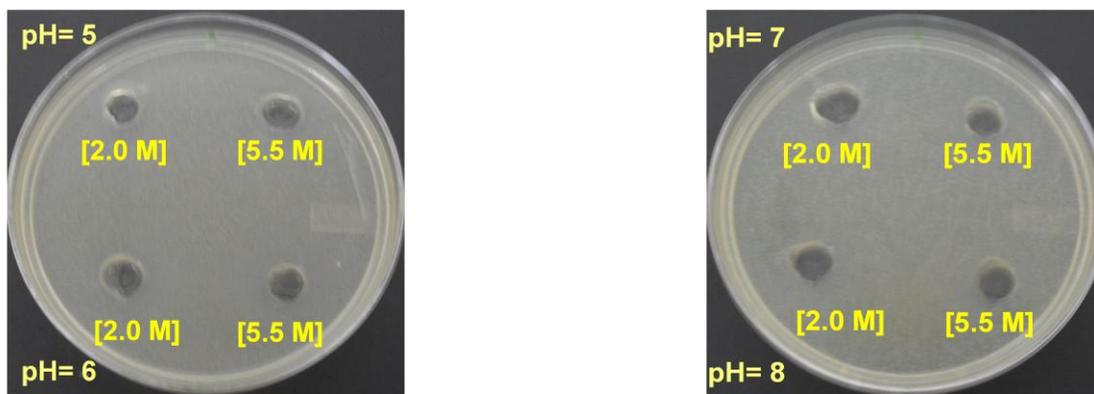


Figura 32. Controles salinos del ensayo de Fuerza Iónica frente a *E. coli*

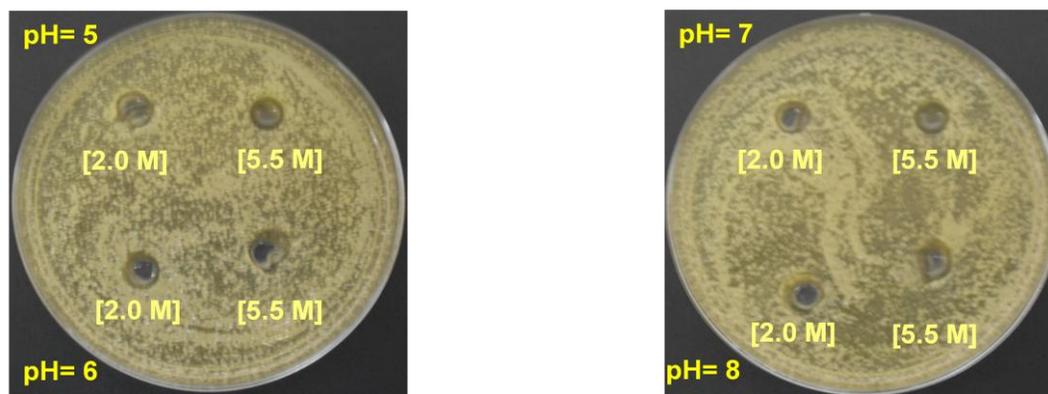


Figura 33. Controles salinos del ensayo de Fuerza Iónica frente a *S. aureus*

6.3.2.1 Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus paracasei*

La actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli* ejercida por los compuestos extracelulares secretados por *L. paracasei* bajo las concentraciones de sal ajustadas a pH 5.0 se muestra en las Figuras 34 y 35. En las mismas se ilustra el incremento presentado en la actividad antibacteriana frente a estos dos microorganismos con respecto a la mostrada en el anterior ensayo de caracterización para *L. paracasei* (Efecto del pH).

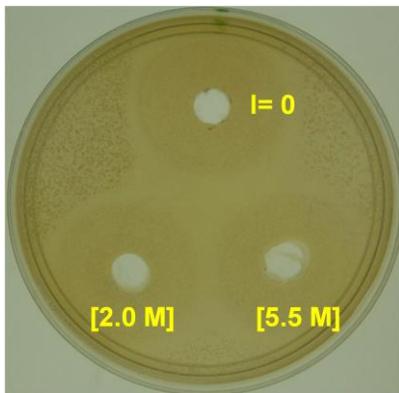


Figura 34. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. paracasei* frente a *E. coli*

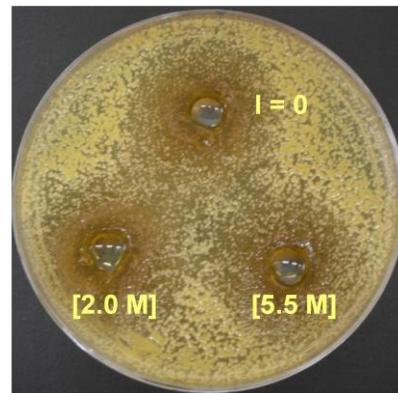


Figura 35. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

Como se observa dicho incremento en la actividad inhibitoria es claramente visible dada la magnitud en los halos de inhibición obtenidos para ambos casos. Esto da pauta para establecer que las altas concentraciones de sal probadas en este ensayo no restringen la actividad antibacteriana de *L. paracasei*, por el contrario pareciera que tiene un efecto positivo sobre ésta.

En la *Figura 36* se visualiza de manera comparativa el efecto que conllevó emplear soluciones salinas con fuerzas iónicas (I) de 0.3422 y 0.9411 en la actividad antibacteriana frente *E. coli* y *S. aureus*. Se observa que para el primer caso, la actividad inhibitoria cuando no se tiene sal en el entorno y a una concentración 5.5 M (I= 0.9411) presenta un comportamiento muy similar, contrario al registrado cuando la concentración de sal es 2.0 M (I=0.3422) donde se exhibe la mayor actividad inhibitoria.

En lo que respecta a *S. aureus*, en el mismo gráfico se muestra que la cepa de *L. paracasei* ejerce una mayor actividad antibacteriana en ausencia de sal (pH óptimo), aun cuando presenta un valor de actividad del 92.4% a una concentración 5.5 M (I=0.9411) de estos iones; sin embargo la actividad inhibitoria bajo una concentración 2.0 M (I=0.3422) es lo suficientemente efectiva sobre dicho microorganismo indicador.

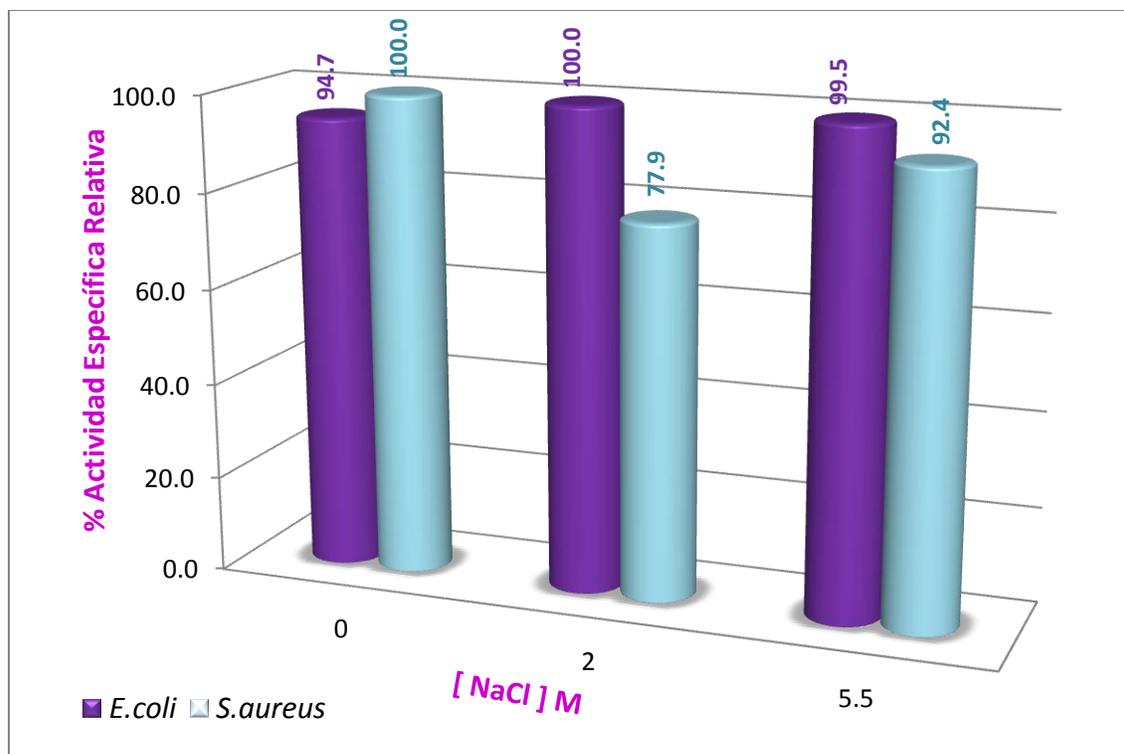


Figura 36. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. paracasei* frente a *S. aureus* y *E. coli*

6.3.2.2 Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Enterococcus faecalis*

En las Figuras 37 y 38 se muestra el efecto que la concentración de sal en el medio de suspensión ajustado para los sobrenadantes de *E. faecalis* ejerce frente *E. coli* y *S. aureus*.

Con base en ellas se puede explicar que el efecto de esta no repercute en la actividad inhibitoria de *E. faecalis* sobre ambos microorganismos, especialmente en el caso de *E. coli*, ya que a diferencia de *S. aureus* pareciera favorecer de manera considerable la actividad antibacteriana de los compuestos extracelulares producidos por la BAL.

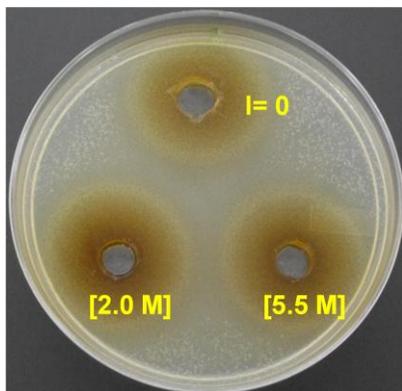


Figura 37. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *E. faecalis* frente a *E. coli*

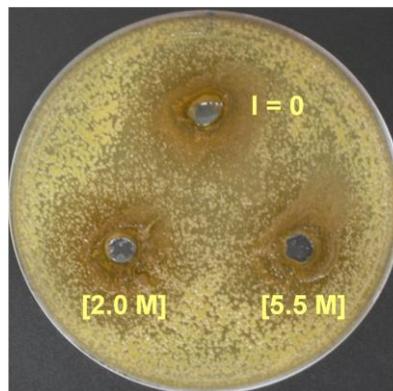


Figura 38. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

La *Figura 39* permite mostrar que la mayor actividad inhibitoria frente a *S. aureus* se registra en ausencia de sal en el medio de suspensión. Las otras dos condiciones ensayadas (2.0 y 5.5 M de NaCl) muestran que la disminución en la actividad es mínima (1.4 y 1.9% respectivamente).

Por otro lado, el comportamiento sobre *E. coli* alcanza un máximo de actividad cuando se tiene una fuerza iónica en el medio equivalente a 0.3422 (2.0 M de NaCl), similar al registrado por la cepa de *L. paracasei*; mientras que en ausencia de sal la actividad es menor (93.7%) comparada con el 98.6% cuando se tiene una fuerza iónica de 0.9411 (5.5 M de NaCl).

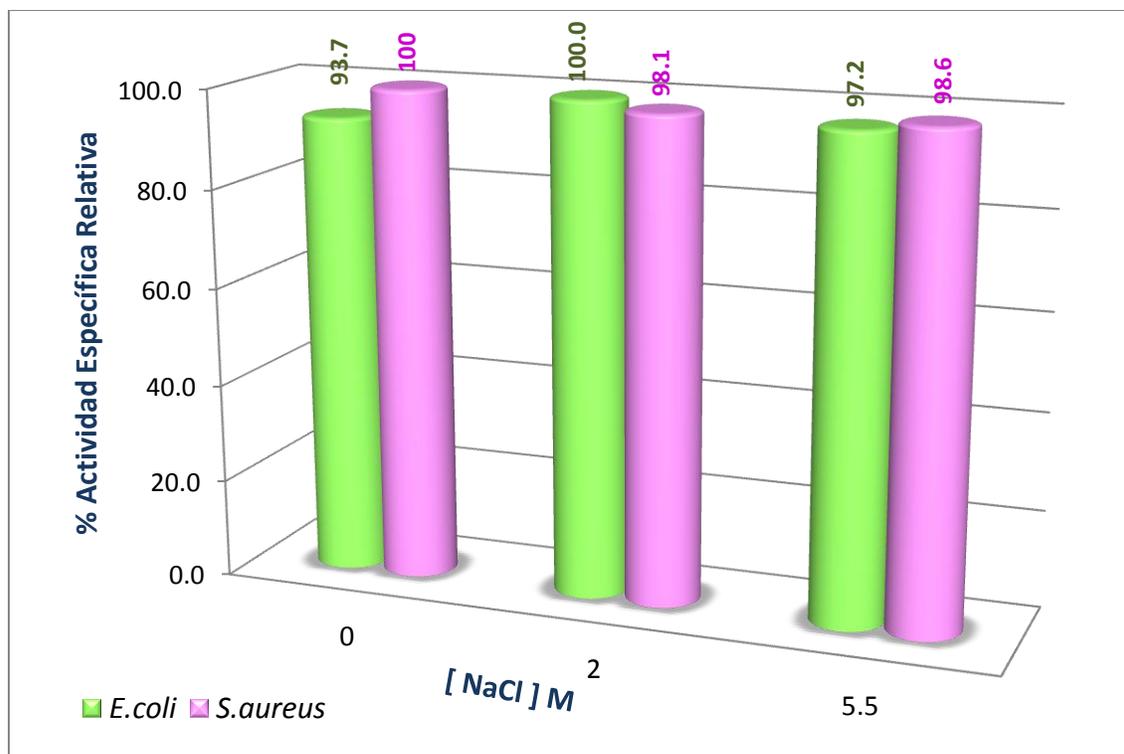


Figura 39. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus* y *E. coli*

6.3.2.3 Efecto de la Fuerza Iónica sobre los sobrenadantes de *Lactobacillus brevis*

Las Figuras 40 y 41 exhiben el resultado que la fuerza iónica del medio de suspensión ajustado al pH óptimo presentó frente a *E. coli* y *S. aureus*. De acuerdo con éstas, se pone de manifiesto que no hay una repercusión negativa de la concentración salina sobre el efecto inhibitorio de los sobrenadantes de *L. brevis* frente a ambos microorganismos indicadores, puesto que se registra una inhibición mayor cuando hay presencia de sal en el medio de suspensión.

Así mismo, en la Figura 42 la actividad inhibitoria más alta se observa cuando la concentración de sal en el medio de suspensión es de 5.5 M de NaCl ($I=0.9411$). A pesar de lo anterior, no se registra una diferencia significativa entre las condiciones ensayadas.

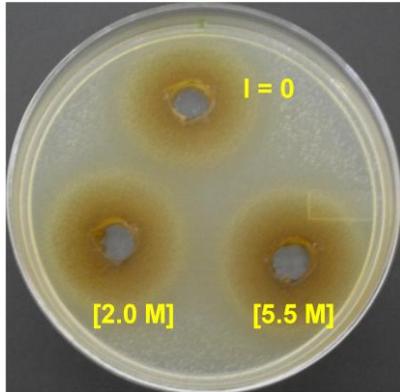


Figura 40. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. brevis* frente a *E. coli*

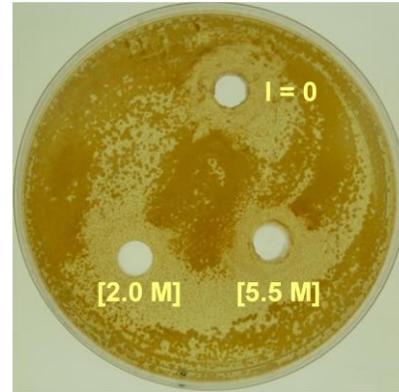


Figura 41. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. brevis* frente a *S. aureus*

El mismo comportamiento se manifiesta en las otras dos condiciones ensayadas (ausencia de sal y una concentración 2.0 M de NaCl), donde se observa que cuando la concentración salina es nula la actividad antibacteriana de *L. brevis* es mayor que al tener una concentración 2.0 M de NaCl.

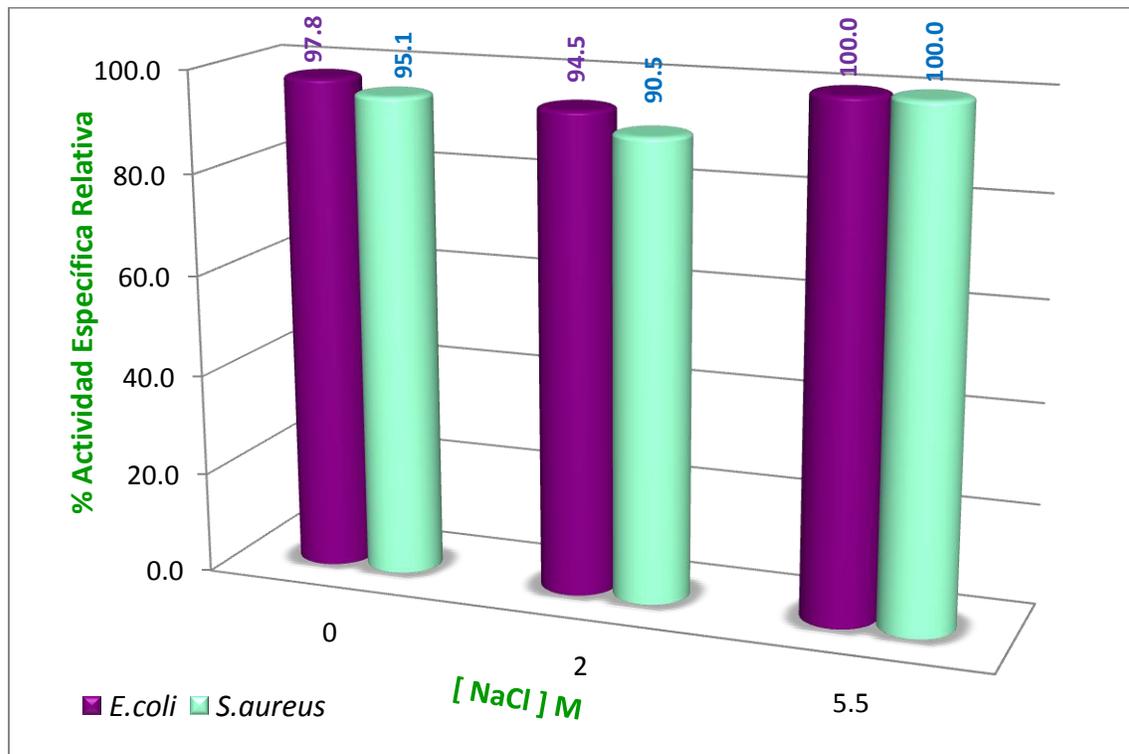


Figura 42. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. brevis* frente a *S. aureus* y *E. coli*

6.3.2.4 Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus pentosus*

Las Figuras 43 y 44 exhiben la tendencia que la fuerza iónica del medio de suspensión (ajustado al pH óptimo) registró sobre los microorganismos *E. coli* y *S. aureus*. Con base en los resultados que se muestran en ellas, se pone de manifiesto la ausencia de una repercusión por parte de la concentración salina sobre el efecto inhibitorio de *L. pentosus* frente a ambos microorganismos indicadores, puesto que se exhibe una inhibición mayor cuando hay una fuerza iónica de 0.9411 en el medio.

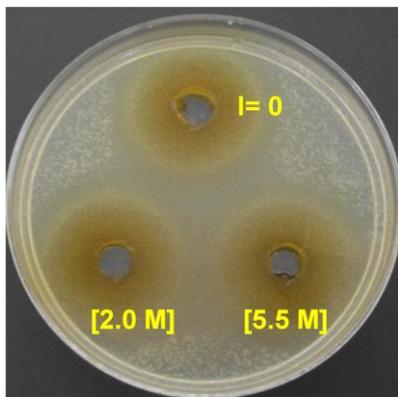


Figura 43. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. pentosus* frente a *E. coli*

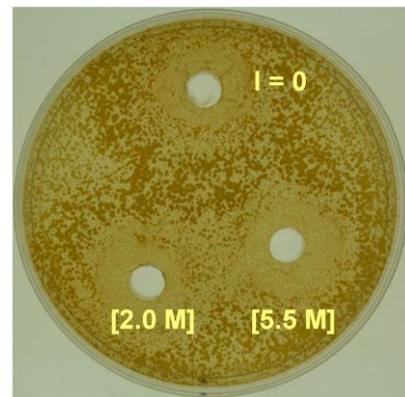


Figura 44. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

La Figura 45 demuestra que la mayor actividad inhibitoria frente a *S. aureus* se presenta cuando la concentración de sal en el medio de suspensión es de 5.5 M de NaCl ($I=0.9411$), por otra parte bajo las otras dos condiciones ensayadas (ausencia de sal y una concentración 2.0 M) muestran que la actividad antibacteriana de *L. pentosus* se modifica en un 3.6% para el primer caso y 7.9% en el segundo.

Así mismo, la máxima actividad sobre *E. coli* se alcanza cuando se tiene una fuerza iónica en el medio equivalente a 0.3422 (2.0 M de NaCl), tendencia similar a la observada con las cepas de *L. paracasei* y *E. faecalis*; mientras que en ausencia de sal la actividad es menor de 98.9% comparada con el máximo y con un 92.5% cuando la fuerza iónica en el medio es de 0.9411 (5.5 M de NaCl).

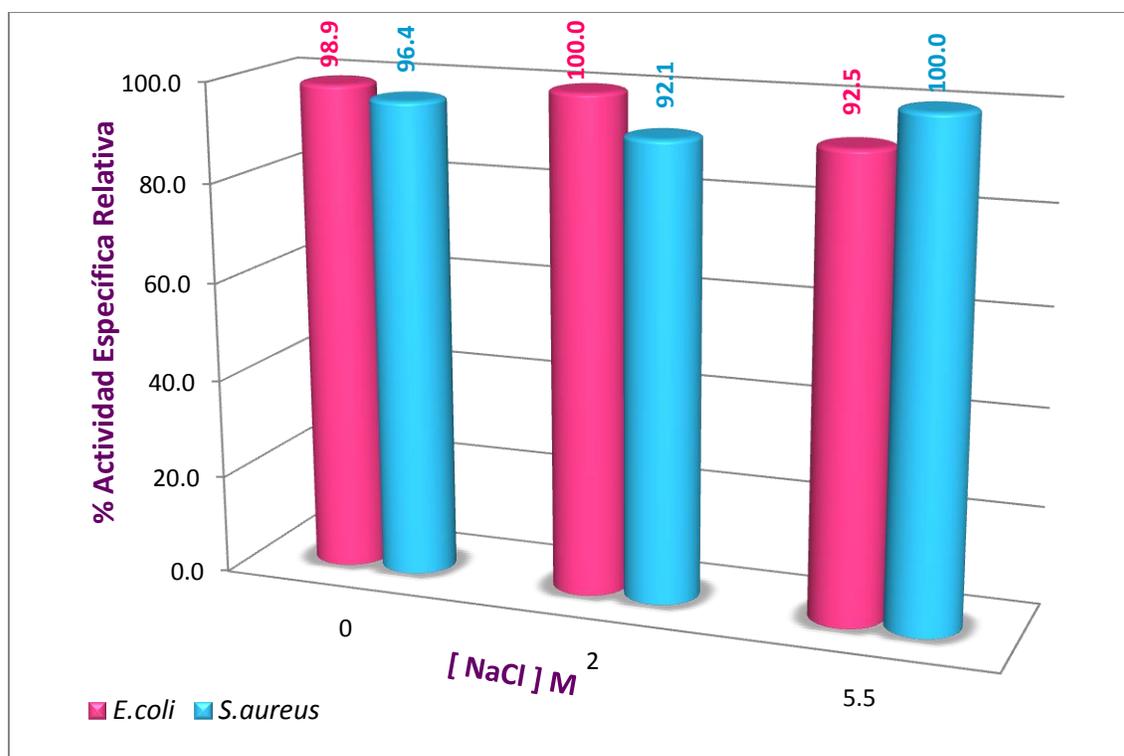


Figura 45. Efecto de la Fuerza Iónica sobre los SN de *L. pentosus* frente a *S. aureus* y *E. coli*

Los resultados anteriormente detallados así como las tablas de actividad para cada cepa de BAL contenidas en el *Anexo II*, permiten afirmar que en general, la incorporación de sal en el medio de suspensión de los compuestos antibacterianos producidos por cada cepa ajustado al pH óptimo de ensayo, tienen un efecto mínimo sobre los niveles de actividad registrados por cada cepa.

Como ya se mencionó, dichas concentraciones salinas se escogieron tratando de asemejar las condiciones de fuerza iónica a las que se enfrentan las BAL en el medio natural del que proceden, el queso Cotija, y han permitido ilustrar que en general el efecto inhibitorio que tienen sobre *E. coli* se registra cuando la fuerza iónica del medio es de 0.3422, es decir una concentración salina 2.0 M; exceptuando el caso de la cepa *L. brevis* donde la mayor inhibición sobre este microorganismo se presenta a una concentración 5.5 M de NaCl ($I=0.9411$).

En lo concerniente al comportamiento frente a *S. aureus*, se ha demostrado una heterogeneidad dado que para el caso de las cepas *L. paracasei* y *E. faecalis* la mayor actividad inhibitoria se presentó en ausencia de fuerza iónica en el medio (resuspensión en el amortiguador de pH óptimo); mientras que para el caso de *L. brevis* y *L. pentosus* la mayor actividad antibacteriana tuvo lugar al incrementar la fuerza iónica a un valor de 0.911 ([NaCl]=5.5M).

6.3.3 EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS SOBRENADANTES DE LAS BAL DEL QUESO COTIJA

Las condiciones que se emplearon en este ensayo fueron seleccionadas con base en los diversos reportes sobre la resistencia térmica que se ha observado presentan los péptidos antibacterianos secretados por las Bacterias Ácido Lácticas y por ello la actual aplicación de la Nisina® (bacteriocina secretada por *L. lactis*) en algunos productos alimenticios (De Vuyst & Vandamme, 1994). Lo anterior permitió determinar la estabilidad de los compuestos extracelulares secretados por las BAL provenientes del queso Cotija y discurrir sobre su posible empleo como bio-conservadores en cierto tipo de alimentos.

6.3.3.1 Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus paracasei*

Las siguientes figuras (*Figura 46 y 47*) ilustran la estabilidad térmica que *L. paracasei* mostró ante los microorganismos indicadores, después de haber sometido el compuesto con actividad antibacteriana presente en los sobrenadantes crudos a las condiciones de temperatura ya descritas con anterioridad.

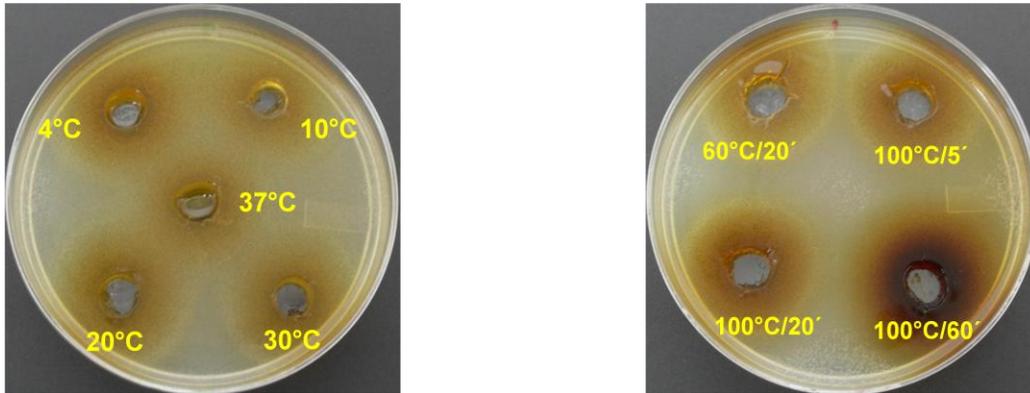


Figura 46. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. paracasei* frente a *E. coli*

Se observó que ninguna de las temperaturas experimentadas parece contribuir de forma negativa en la actividad antibacteriana que esta cepa ejerce sobre *E. coli*; por el contrario dicha actividad frente a *S. aureus* no se mantuvo relativamente estable, dado que se registraron variaciones significativas bajo los tratamientos ensayados. Así mismo, los halos de inhibición que se registraron bajo las primeras condiciones de calentamiento muestran que la actividad inhibitoria sobre ambos microorganismos se incrementa conforme el tiempo de calentamiento se prolonga.

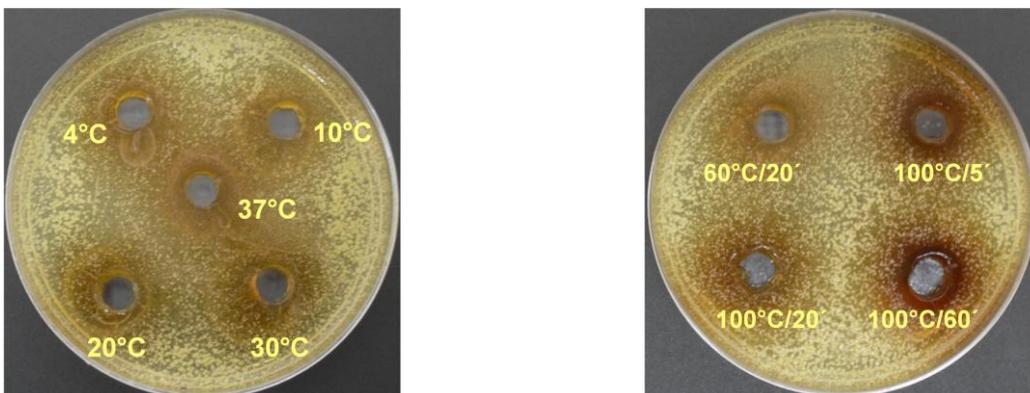


Figura 47. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

En lo que respecta al comportamiento expuesto en la *Figura 48*, se puede observar que los sobrenadantes de *L. paracasei* muestran actividad inhibitoria frente a *E. coli* bajo todas las condiciones de incubación ensayadas con actividades específicas relativas superiores al 50% y con un máximo de actividad durante el tratamiento a 100°C durante 60 minutos. Por otro lado, se mostró una ligera variación en la actividad antibacteriana dentro del rango de temperaturas comprendidas entre 4° y 37°C, seguido de una estabilidad en ella conforme se da un incremento en la severidad del tratamiento térmico realizado al sobrenadante crudo.

El efecto observado frente a *S. aureus* difiere con respecto a la actividad anterior registrada, tal como ilustra en la *Figura 49* los sobrenadantes de *L. paracasei* presentaron una baja actividad antibacteriana (menor al 50%) principalmente a las temperaturas comprendidas entre los 4° y 37°C, la cual se incrementa gradualmente al realizar un calentamiento mayor de los sobrenadantes de esta cepa de BAL. La máxima actividad antibacteriana se observó al calentar a 120°C durante 20 min, pese a que en tratamientos previos se observan actividades superiores al 80%.

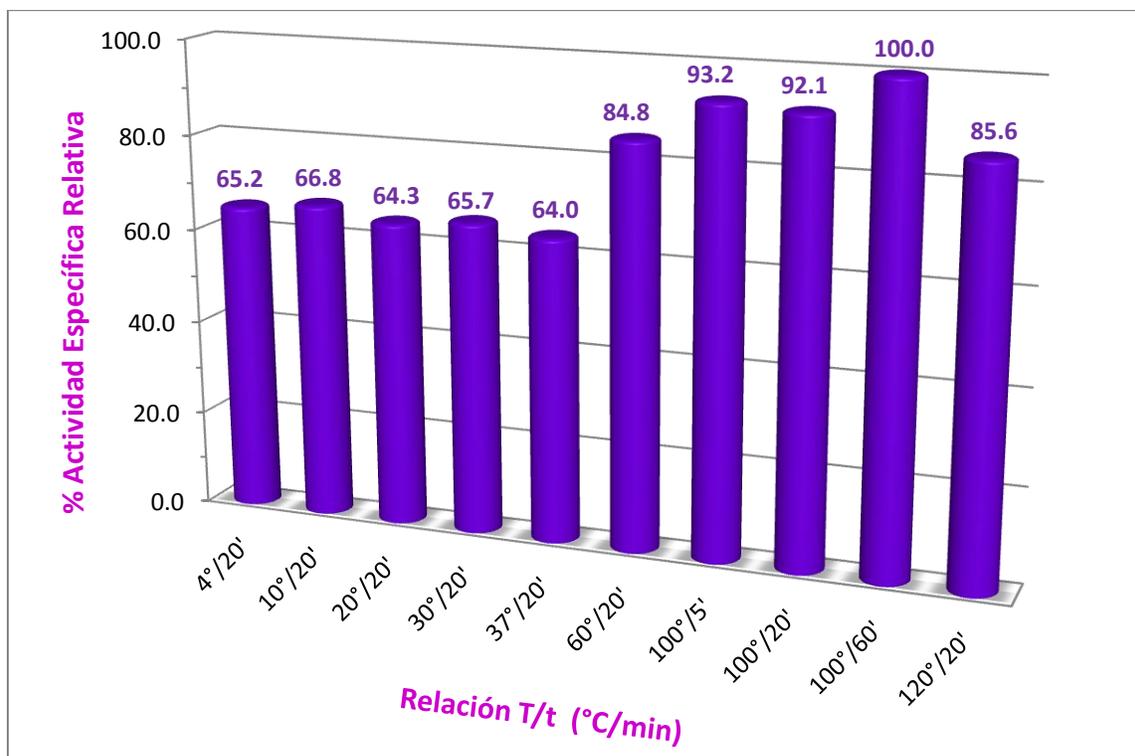


Figura 48. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. paracasei* frente a *E. coli*

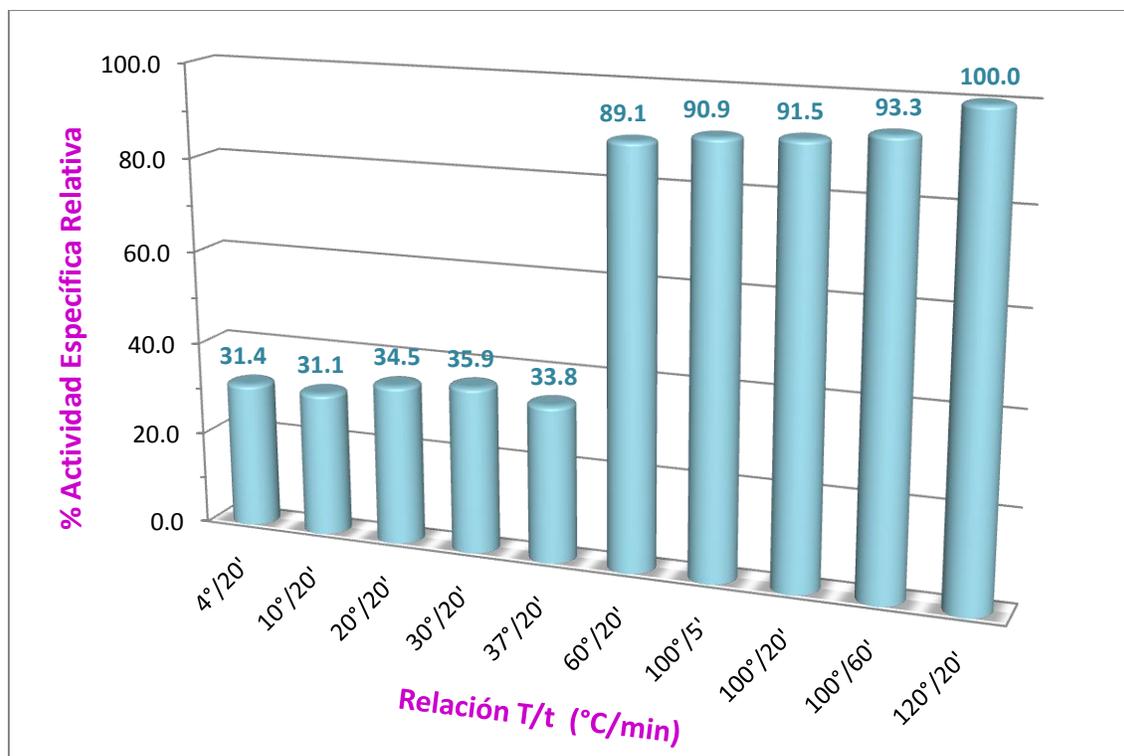


Figura 49. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

De acuerdo con los resultados anteriores, se observó una estabilidad térmica importante en los sobrenadantes de *L. paracasei*; registrándose una mayor estabilidad frente a *E. coli* con valores en actividad antibacteriana superiores al 50% dentro del rango de temperaturas de 4° a 37°C. Por otra parte, es destacable la estabilidad que mostraron los sobrenadantes, ante condiciones más severas de calentamiento, frente a ambos microorganismos ya que no sólo se logró mantener la actividad antibacteriana sino incrementarla cuando la exposición al calentamiento fue mayor.

6.3.3.2 Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Enterococcus faecalis*

Para esta BAL tampoco se presentó una disminución considerable en la actividad inhibitoria ejercida frente a los microorganismos indicadores *S. aureus* y *E. coli*, bajo las

condiciones a las que se incubaron los sobrenadantes previo a su ensayo para determinar la actividad antibacteriana remanente en ellos (*Figuras 50 y 51*).

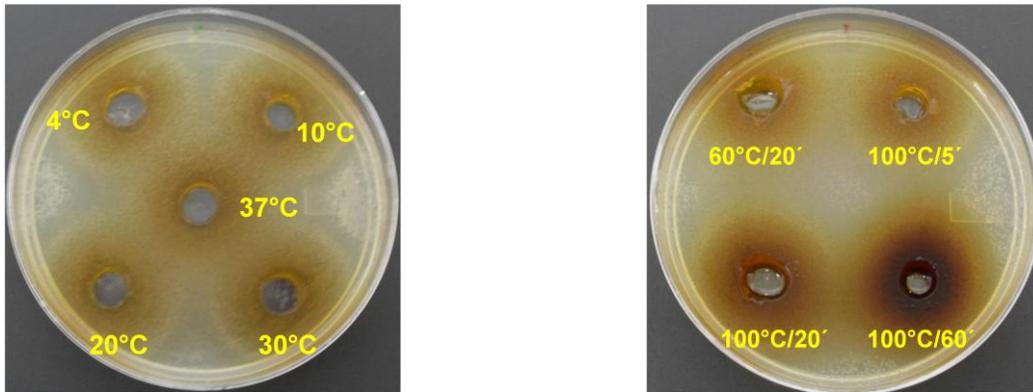


Figura 50. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *E. coli*

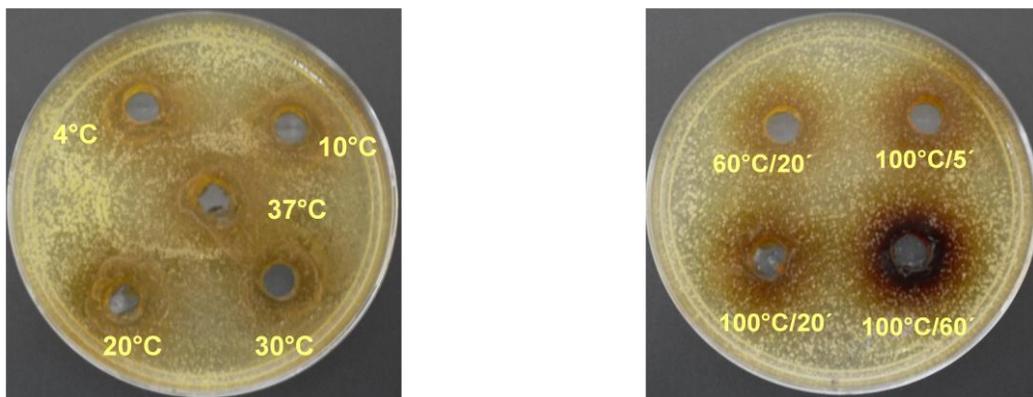


Figura 51. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

En la *Figura 52* se muestra el comportamiento en la actividad inhibitoria de los sobrenadantes frente a *E. coli*, como se observa dicha actividad se mantuvo estable a lo largo de los diversos tratamientos ensayados. En ellos la actividad antibacteriana no presento variaciones considerables hasta el tratamiento de 37°C, registrando valores superiores al 60%; sin embargo al incrementarse la severidad del tratamiento se da un aumento en la estabilidad de los compuestos extracelulares presentes en los sobrenadantes de *E. faecalis* y se alcanza la máxima actividad antibacteriana a 100°C durante 60 min de calentamiento.

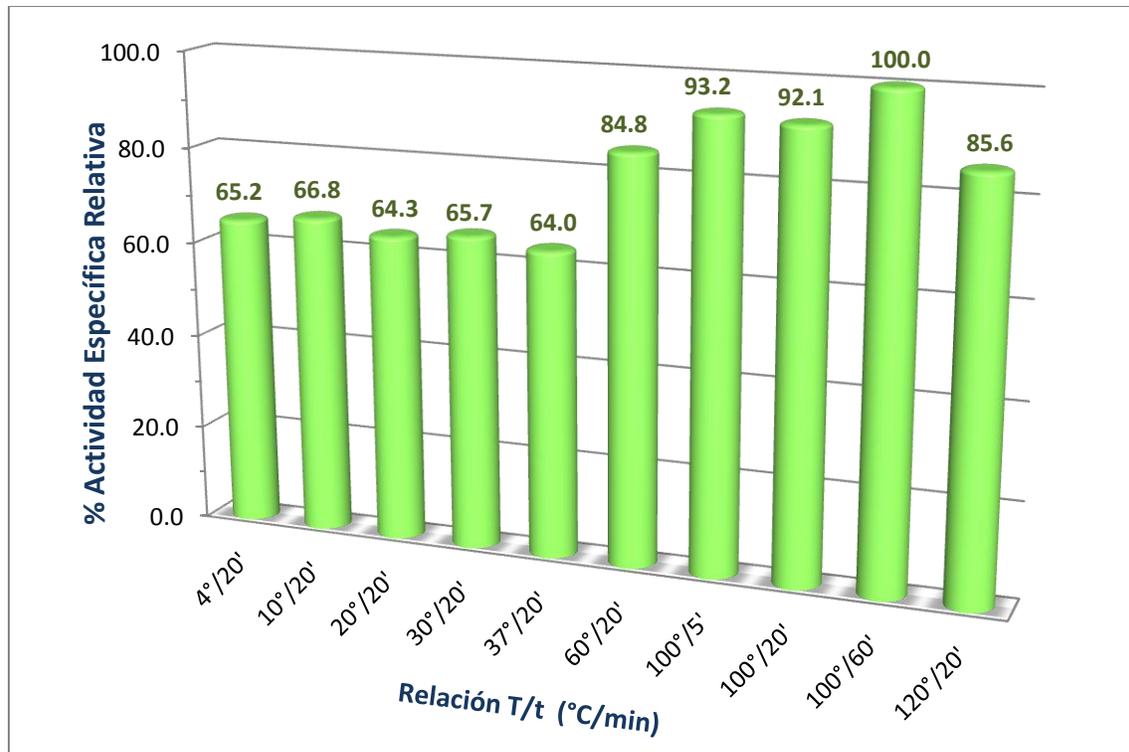


Figura 52. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *E. coli*

Por otra parte en la *Figura 53*, se puede observar el comportamiento de los sobrenadantes de *E. faecalis* frente a *S. aureus*. En la misma queda evidenciada la estabilidad registrada por los sobrenadantes para presentar actividad antibacteriana frente a este microorganismo a las bajas temperaturas ensayadas (4°-37°C), pues en todas estas condiciones dicha actividad presento muy poca variación (cerca al 40%). En lo que respecta a los tratamientos más prolongados, nuevamente se observó un incremento en la actividad antibacteriana en función del aumento en la severidad del calentamiento, registrándose la mayor actividad bajo el mismo tratamiento registrado frente a *E. coli* (100°C/60 min).

El comportamiento observado frente a los dos microorganismos indicadores anteriormente descrito, podría explicarse con base en la capacidad que presenta el género *Enterococcus* para desarrollarse bajo un amplio rango de temperaturas, característica estudiada por Ogier *et al.* (2008) y a la estabilidad térmica que presentan las bacteriocinas producidas por el género (Nes *et al.*, 2007).

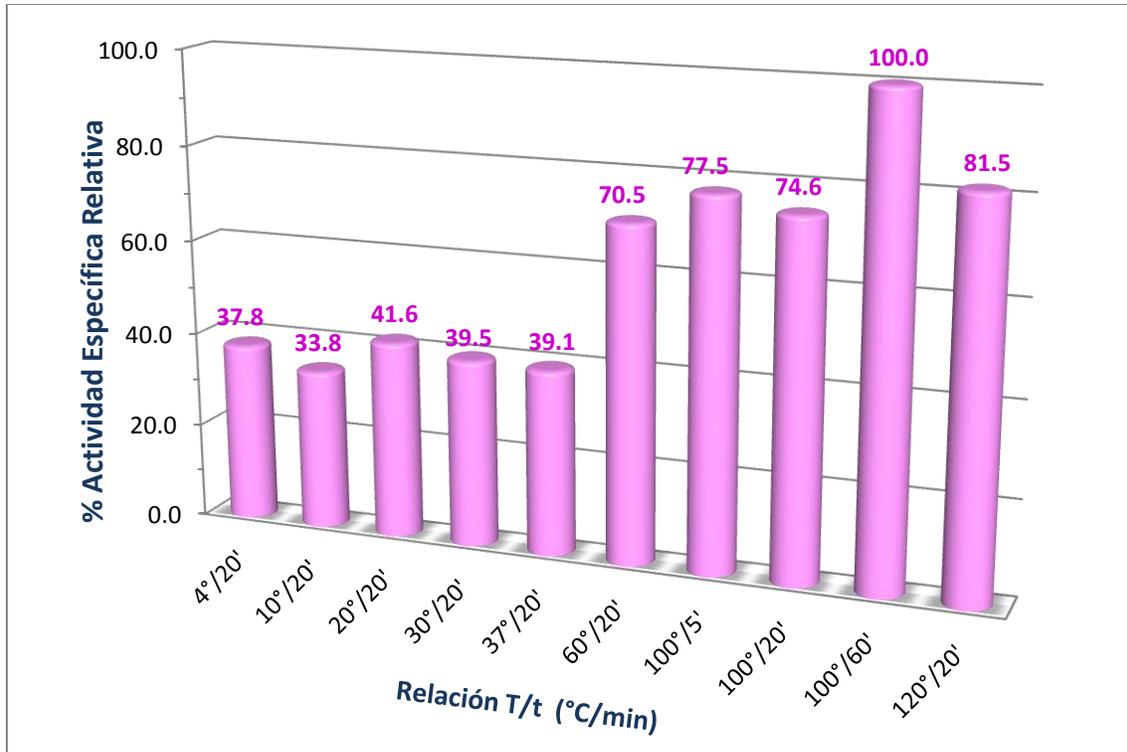


Figura 53. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

6.3.3.3 Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus brevis*

La actividad antibacteriana por parte de los sobrenadantes de *L. brevis* no presentó un decaimiento considerable en la actividad antibacteriana frente a los microorganismos indicadores cuando se someten a calentamiento (*Figuras 54 y 55*).

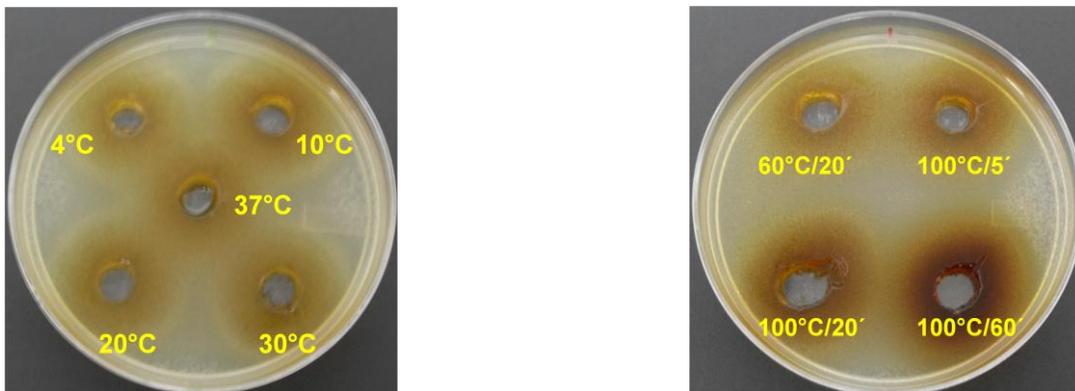


Figura 54. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. brevis* frente a *E. coli*

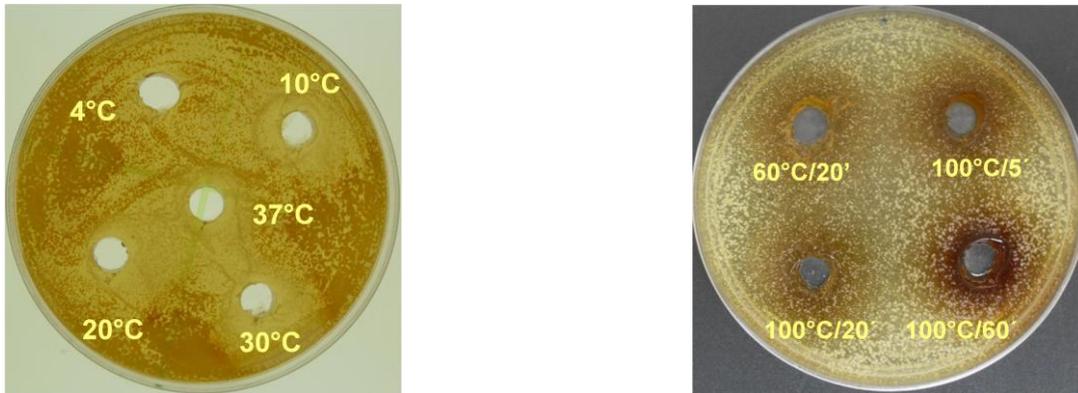


Figura 55. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. brevis* frente a *S. aureus*

Por otra parte en la *Figura 56* se observa que la actividad antibacteriana de *L. brevis* frente a *E. coli* se mantiene bastante estable en todas las temperaturas ensayadas, presentándose menos variabilidad en su comportamiento durante los primeros cinco tratamientos realizados a 20 min; en los que la magnitud de la actividad específica relativa de inhibición se encuentra por encima del 60%.

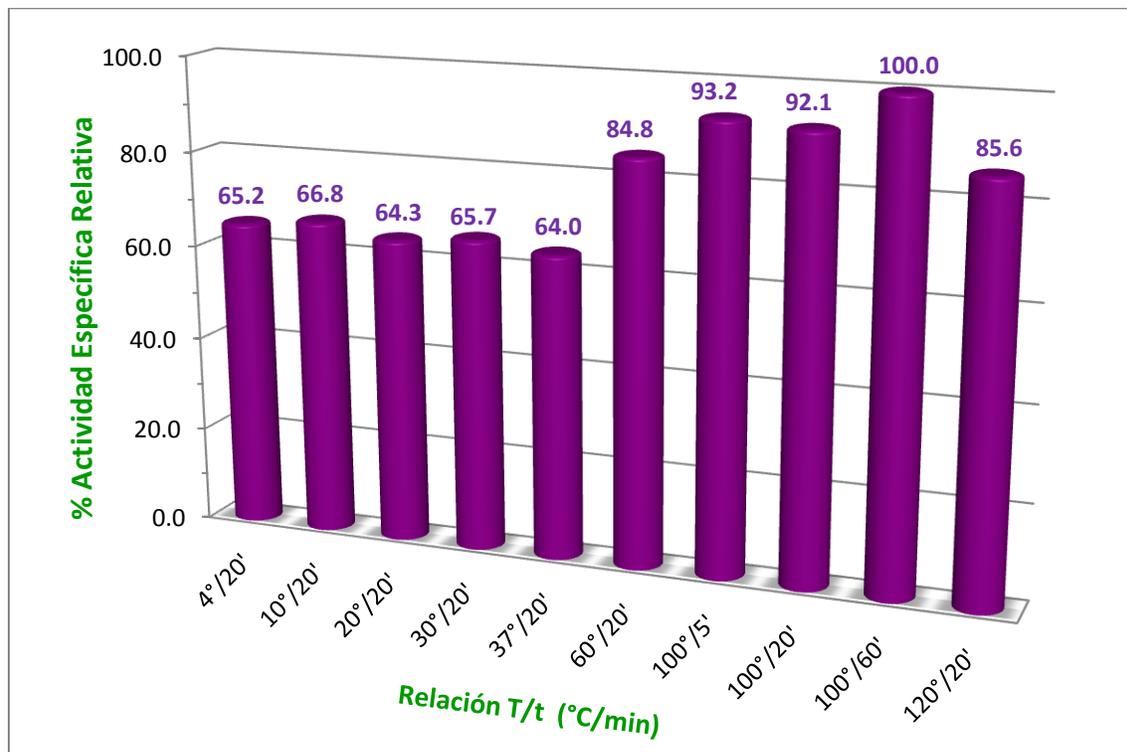


Figura 56. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *E. coli*

Por el contrario, las mayores actividades antibacterianas frente a *E. coli* se observaron cuando se sometieron a los tratamientos más drásticos los sobrenadantes de *L. brevis*. El máximo de actividad inhibitoria se registró a 100°C durante un tiempo de calentamiento de 60 minutos, aunque cabe mencionar que en los tratamientos previos a éste se presentaron actividades antibacterianas del 90%.

El comportamiento frente a *S. aureus* es muy semejante al descrito frente a *E. coli* (Figura 57), sin embargo en este caso se observan diferencias en la magnitud de la actividad antibacteriana durante las primeras cinco condiciones de calentamiento. Por ejemplo, a 30°C se muestra una actividad superior al 70% siendo que las condiciones previas y posterior (37°C) presentan actividades inhibitorias muy semejantes entre sí (60% de actividad).

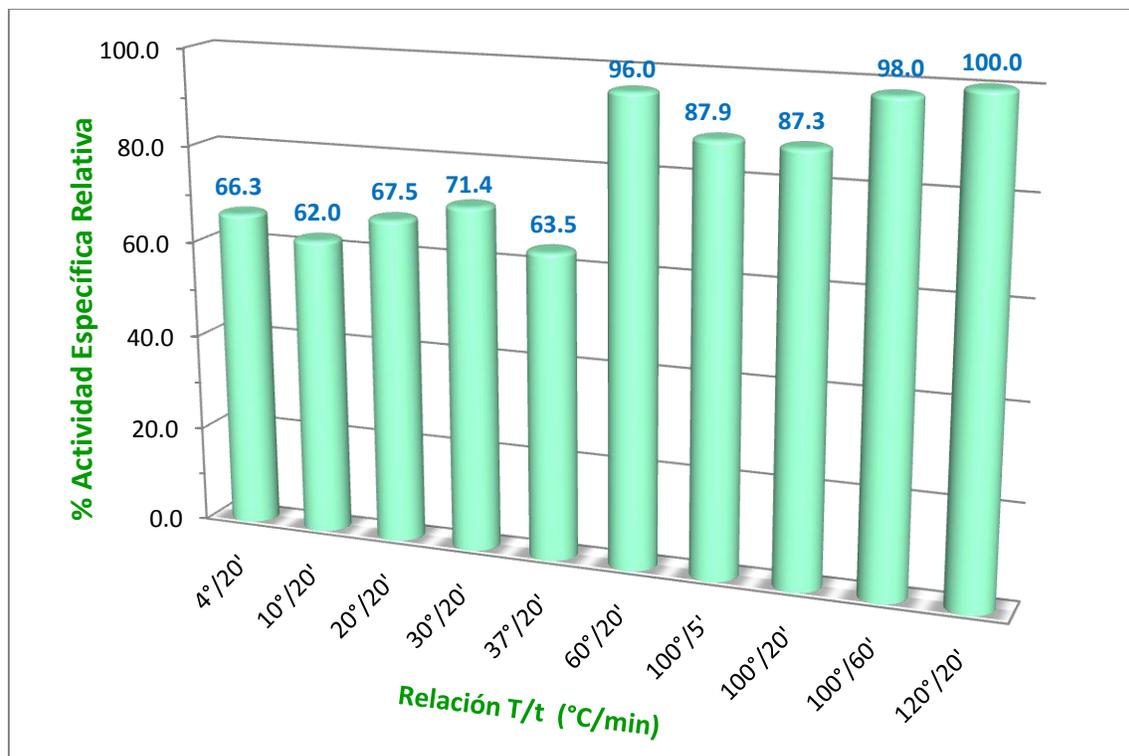


Figura 57. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

Así mismo, se puede observar que la mayor actividad antibacteriana se alcanza a 120°C durante 20 minutos, pero bajo las condiciones de 60°C/ 20' y 100°C/60' se registran actividades inhibitorias muy cercanas al máximo. La variabilidad mostrada bajo los tratamientos más severos podría indicar la estabilidad térmica que presentan los sobrenadantes de *L. brevis* para inhibir a *S. aureus*, e incluso la presencia de diversos compuestos con actividad antibacteriana que presentan cierta especificidad para ejercer inhibición frente a este microorganismo a diferentes condiciones de incubación.

Con base en estas observaciones se puede describir que una de las consideraciones importantes para determinar la actividad inhibitoria de BAL productoras de compuestos antibacterianos es la pureza del concentrado extracelular. Dado que el comportamiento que presenta frente a cada uno de los microorganismos indicadores es muy distinto, esto pareciera indicar la presencia de dos o más compuestos.

6.3.3.4 Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los sobrenadantes de *Lactobacillus pentosus*

El comportamiento en la actividad inhibitoria frente a *E. coli* y *S. aureus* mostrado por los sobrenadantes de *L. pentosus*, se ilustra en las Figuras 58 y 59, donde se demuestra que la actividad antibacteriana se incrementa conforme la temperatura de calentamiento se eleva.



Figura 58. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. pentosus* frente a *E. coli*

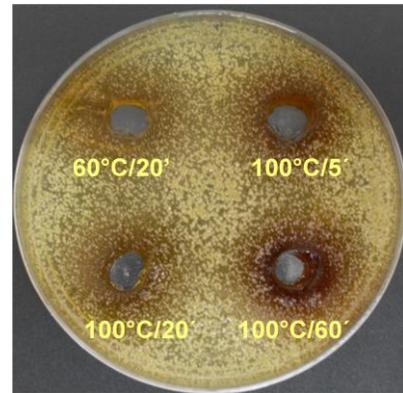
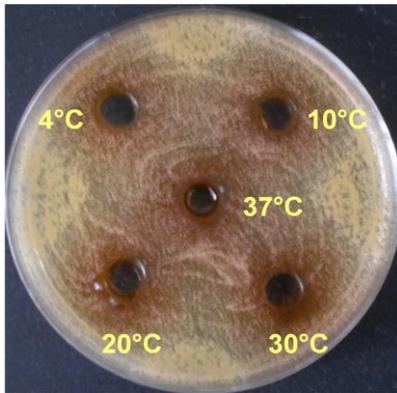


Figura 59. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

Respecto a la *Figura 60*, se puede observar que el efecto inhibitorio que ejerce *L. pentosus* frente a *E. coli* registra actividades con poca diferencia bajo las condiciones de incubación ensayadas; es decir, se presenta un incremento gradual en la actividad antibacteriana conforme se intensifican los tratamientos térmicos.

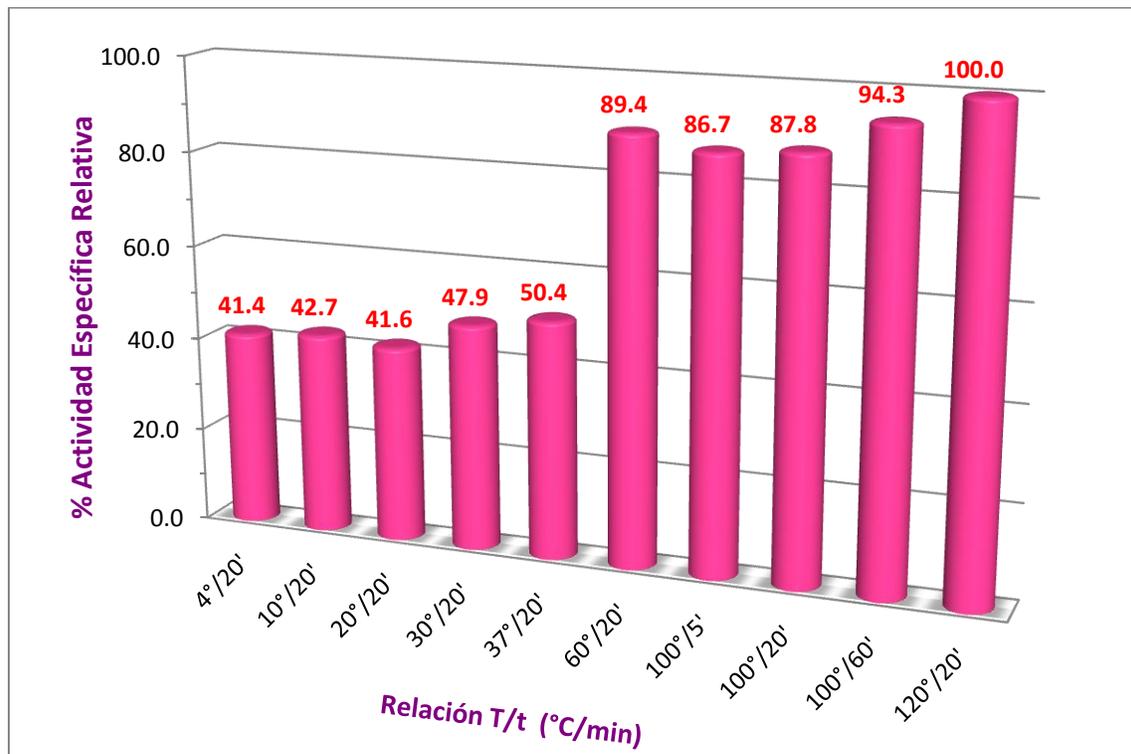


Figura 60. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. pentosus* Frente a *E. coli*

El máximo de actividad antibacteriana se presenta en la relación 120°C/20 min; sin embargo, aún cuando bajo esta condición se registra la mayor actividad, cabe destacar que los porcentajes de actividad obtenidos en las condiciones previas (60° y 100°C respectivamente) demuestran que la termoestabilidad de los sobrenadantes de *L. pentosus* frente a este microorganismo indicador son muy semejantes.

Así mismo, para el caso de *S. aureus* se ilustra que los sobrenadantes de *L. pentosus* incrementan su actividad inhibitoria después de los 37°C, siendo las condiciones de incubación a 10° y 20°C las que mostraron los menores valores de actividad antibacteriana en lo que respecta a la temperaturas de calentamiento más bajas (*Figura 61*).

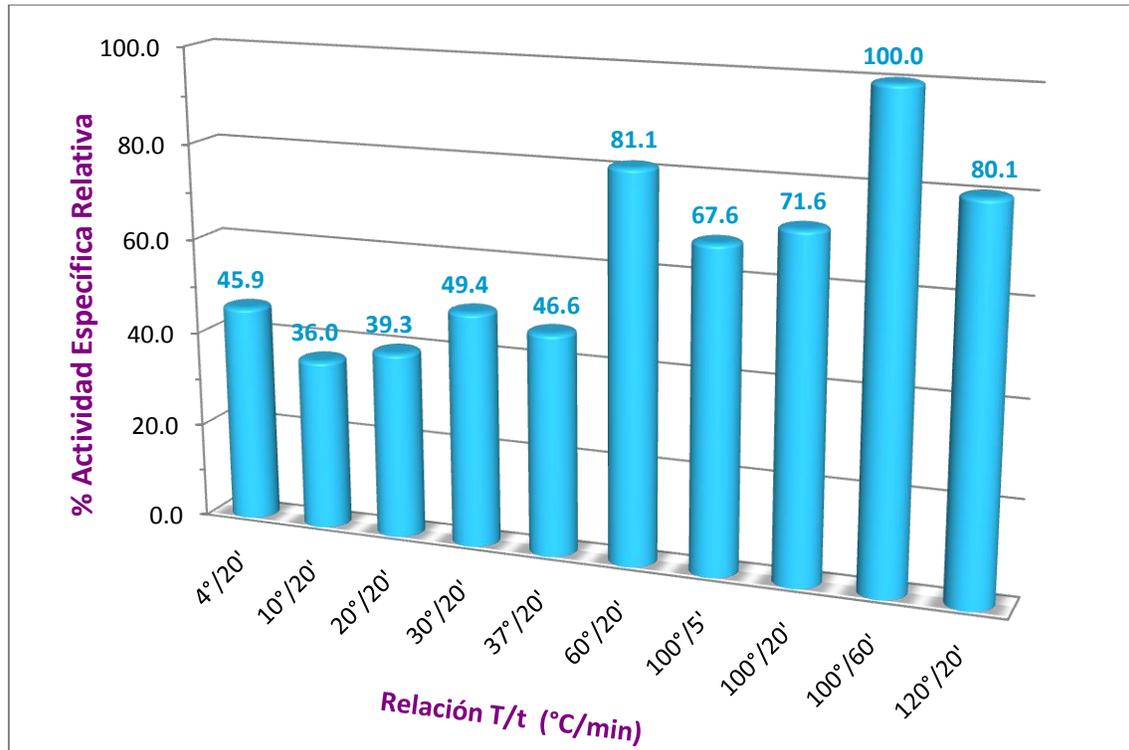


Figura 61. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

La mayor actividad antibacteriana frente a este microorganismo se presentó bajo la condición 100°C/60 min, mientras que a la misma temperatura durante un tiempo de calentamiento de 5 y 20 min se registró la menor actividad inhibitoria

En lo que respecta a las condiciones de calentamiento de 60°C y 120°C durante 20 min, se observa una similitud en la actividad registrada, poniendo en evidencia que existe un comportamiento similar en la actividad bajo dichas condiciones.

Finalmente en las *Figuras 62 y 63* se muestra el efecto inhibitorio que cada una de las BAL ejerció sobre los microorganismos *E. coli* y *S. aureus* cuando sus respectivos sobrenadantes fueron sometidos a un calentamiento de 120°C durante un tiempo de 20 min.

Como se puede observar, aún bajo este calentamiento extremo, se logró observar actividad antibacteriana por cada una de las cepa de BAL; demostrando con ello la termoestabilidad que presentan los compuestos antibacterianos presentes en los sobrenadantes crudos de estas cepas aisladas del queso Cotija. De acuerdo a lo anterior, se corrobora también la resistencia térmica que presentan los compuestos antibacterianos secretados por las BAL (De Vuyst & Vandamme, 1994; Rodríguez *et al.*, 2000).

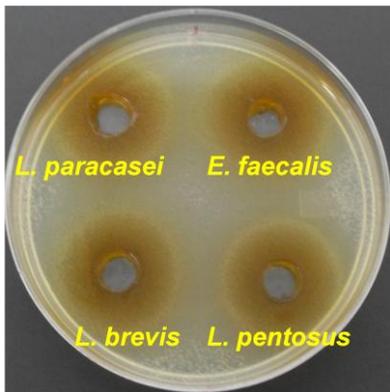


Figura 62. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de las BAL frente a *E. coli* calentamiento 120°C/ 20 min

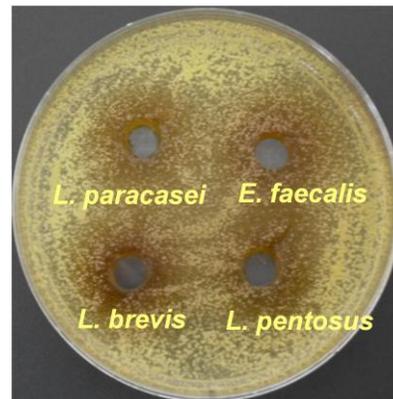


Figura 63. Efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los SN de las BAL frente a *S. aureus* calentamiento 120°C/ 20 min

Con base en todos los resultados expuestos, se logró determinar el efecto de la temperatura sobre la actividad antibacteriana de los compuestos antibacterianos secretados por las BAL aisladas del queso Cotija, ya que se observó una marcada estabilidad a altas temperaturas como otras cepas de BAL productoras de bacteriocinas estudiadas por otros grupos de investigación (Rodríguez *et al.*, 2000). Dichos compuestos resisten temperaturas extremas y tiempos prolongados de calentamiento sin perder su actividad. Bajo las condiciones ensayadas incluso se observa un mayor efecto inhibitorio conforme se registra un incremento en la temperatura de calentamiento probada.

DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra que los microorganismos provenientes del Queso Cotija, producen compuestos con actividad antibacteriana. Lo anterior, no es de sorprender puesto que se tienen otros reportes sobre el aislamiento de bacterias lácticas a partir de quesos que presentaron la particularidad de producir compuestos con actividad antibacteriana. Cabe resaltar la coincidencia en los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* que se presentan en los trabajos de Gulahmadov, *et al.* (2009) y de Rodríguez *et al.* (2000).

En los resultados mostrados, se encontró que los compuestos antibacterianos extracelulares provenientes de las cepas de BAL aisladas a partir del Queso Cotija, presentan:

- La capacidad de actuar bajo un amplio rango de pH que considera los valores de 5.0 a 8.0, de manera que si contribuyen con la inocuidad observada en el queso Cotija, ya que en el producto madurado este parámetro se encuentra entre 4.8 y 5.2.

-
-
- ④ Presentan estabilidad térmica frente a las diversas temperaturas ensayas, destacándose el hecho de que presentan actividad antibacteriana bajo la temperatura de elaboración y maduración del queso Cotija (temperatura ambiente de la región, aproximadamente de 20°C-25°C), y una termorresistencia considerable que les permitiría su posible aplicación en la elaboración de productos procesados térmicamente.
 - ④ Su actividad antibacteriana no se ve disminuida bajo ninguna de las concentraciones de sal ensayadas, y son capaces de ejercer dicha actividad bajo las condiciones de salado que se emplean en la elaboración y maduración del queso Cotija (aproximadamente 3.5-10%).

Rodríguez *et al.*, (2000) aislaron 321 cepas productoras de compuestos antibacterianos a partir de leche cruda de vaca, oveja y cabra que presentaron actividad frente a *C. tyrobutyricum*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*, microorganismos todos de interés sanitario en la industria láctea. La mayor actividad antibacteriana se presentó en cepas identificadas a nivel de género como *Lactococcus* (67 muestras), *Enterococcus* (8 muestras), *Lactobacillus* (5 muestras) y *Leuconostoc* (2 muestras). Ellos realizaron una caracterización más detallada en 16 muestras no identificadas completamente para determinar la sensibilidad a la temperatura de los sobrenadantes bajo calentamiento a 60°C durante 60 min y 100°C durante 20 min o condiciones de autoclave 121°C/15 min; el efecto del pH a valores 2, 6, 7 y 9. A partir de ambos ensayos, se determinó que la mayor actividad inhibitoria se presentaba a un pH de 6, con excepción de una bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* TAB 82 que mostró la mayor actividad a un pH de 7; en lo que respecta a los pH 2 y 9 se observó en la mayoría de los SN una marcada estabilidad, exceptuando las bacteriocinas de *L. lactis* subsp. *lactis* TAB 4 y TAB 32, *E. faecium* TAB 7 y *L. paracasei* subsp. *paracasei* TAB 6 que se inactivaron a un pH de 2. Únicamente se presentó inactivación después del tratamiento térmico a 60°C durante 60 minutos por parte de la bacteriocina de *L. lactis* subsp. *lactis* TAB 32; posterior al tratamiento a 100°C durante 20 min, la gran mayoría de la bacteriocinas registraron actividad, exceptuando los compuestos antibacterianos producidos por *L. lactis* subsp.

lactis TAB 32, *L. paracasei* subsp. *paracasei* TAB 48, y *Leuconostoc* spp. TAB 53. Finalmente, las bacteriocinas de *L. lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis TAB 57 y TAB 67, *L. lactis* subsp. *lactis* TAB 82, *E. faecium* TAB 7, *E. faecalis* TAB 20 y TAB 52, *L. paracasei* subsp. *paracasei* TAB 6 y *L. plantarum* TAB 84 mantuvieron la mayoría de su actividad inhibitoria después de un tratamiento de autoclave. Con base en sus resultados, concluyen que dada la resistencia mostrada por las cepas aisladas a partir de esos tipos de leche para soportar altas temperaturas, estabilidad a pH ácidos y básicos y su espectro de actividad es posible su empleo como bio-conservadores en alimentos; sin embargo, aclaran se requiere una investigación mayor para determinar la posible identidad como bacteriocinas.

Por su parte, Gulahmadov *et al.* (2009) aislaron algunas BAL a partir de quesos de la región de Azerbaijan, caracterizadas como *L. buchneri* (4 cepas), *L. pentosus*, *L. brevis*, *L. fermentum* y *L. collinoides* con la capacidad de producir sustancias con actividad bactericida (BLIS). De las BAL identificadas, *L. pentosus* y una cepa de *L. buchneri* que mostraron la mayor actividad frente a diversos microorganismos indicadores, fueron ensayadas para determinar su estabilidad a la temperatura y concentración de sal (% NaCl), debido a que la producción de compuestos con actividad bactericida puede ser influida por el pH del medio y la concentración de sales minerales.

Para caracterizar el efecto del pH de ambas BAL frente a *L. bulgaricus*, los sobrenadantes crudos fueron ajustados a un pH de 3, 5, 6.5, 9, 11 y 12 respectivamente. Se observó que el pH óptimo para ambos microorganismos fue aproximadamente de 7, dado que la actividad inhibitoria se mantuvo estable entre los valores de pH de 5 y 9, con un incremento a pH 6.5; mientras que a los valores de pH extremos dentro del rango estudiado (3 y 11) se registró una inhibición en la actividad antibacteriana registrada. Estudiaron también la influencia de la concentración de sal en el medio, probando concentraciones de 0%, 3% y 6% de NaCl. Se determinó que la actividad inhibitoria de *L. pentosus* fue ligeramente disminuida en presencia de 3% de NaCl, mientras que la de *L. buchneri* fue considerablemente reducida (en comparación con el control, ausencia de sal). La presencia de un 6% de NaCl incrementó la

actividad inhibitoria de *L. pentosus*, caso opuesto frente a *L. buchneri* cuya actividad nuevamente disminuyó de manera drástica. Finalmente concluyeron que la presencia de sal no disminuye considerablemente la actividad antibacteriana en la cepa de *L. pentosus*, y que aún cuando *L. buchneri* demuestra una mayor sensibilidad ante la presencia de ésta; ambas cepas de BAL aisladas de quesos tradicionales de la región de Azerbaijan presentan una tolerancia que les permitiría ser empleados como cultivos iniciadores en la fabricación de algunas leches fermentadas, quesos, aceitunas y coles.

Los trabajos anteriores muestran, pues, que a partir de quesos se pueden aislar microorganismos cuyas sustancias antibacterianas son activas a pH cercano a la neutralidad, tolerantes a altas temperaturas y altas fuerzas iónicas, tal como ocurre en el trabajo que se presenta por nuestra parte.

Si se parte de la definición de bacteriocinas, se tiene pleno conocimiento de la actividad inhibitoria que dichos compuestos ejercen principalmente sobre microorganismos Gram positivos y aquellos relacionados filogenéticamente, siendo pocos los casos en los que se ha reportado actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram negativos. Sin embargo, en éste trabajo se registró actividad antibacteriana por parte de los compuestos extracelulares aislados a partir del queso Cotija sobre la bacteria *E. coli* DH5 α , lo cual resulta muy novedoso y abre la posibilidad de que se trate de bacteriocinas no reportadas o de sustancias diferentes que también presentan actividad inhibitoria.

Éste hallazgo sobre actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram negativos como *E. coli* es muy importante y al mismo tiempo coincide con las observaciones realizadas por otros grupos de investigación (De Kwaadsteniet *et al.*, 2005; Gänzle *et al.*, 1999; Simonetta *et al.*, 1997).

Gänzle *et al.*, (1999) encontraron que dentro de las especies de *E. coli* incluyendo las patógenas, presentan la capacidad de tolerar condiciones ambientales extremas, tales como concentraciones elevadas de sal, valores de pH bajos y prolongados tiempos de

almacenamiento a temperaturas de refrigeración. Demostraron que diversas cepas de *E. coli* incluyendo la cepa patógena, *E. coli* O157:H7, muestran una mayor sensibilidad para ser atacadas por las bacteriocinas nisina y curvacina A cuando se ponen a crecer en el medio óptimo modificado con altas concentraciones de NaCl y de iones hidrogeno H^+ (pH bajos); aunque no se registró el mismo comportamiento cuando se realizaba la pre-adaptación de estos microorganismos a dichas condiciones estresantes. Sus resultados mostraron una mayor sensibilidad por parte de *E. coli* O157:H7 frente a dos bacteriocinas provenientes de cepas de BAL, un hecho que incrementa las expectativas sobre el posible empleo de las bacteriocinas de BAL para el control de este microorganismo en algunos alimentos conservados bajo condiciones muy similares a las ensayadas. Una de las explicaciones emitidas para esclarecer el comportamiento registrado, radica en el hecho de que algunos sitios de unión de los iones divalentes presentes en la membrana externa de las bacterias Gram (-) son reemplazados por los iones sodio e hidrógeno que se encuentran en altas concentraciones en el medio; ocasionando con ello la sensibilidad mostrada en las células bacterianas.

Sin embargo, destacan la importancia de considerar que la membrana externa de este grupo de bacterias no impide la afluencia total de inhibidores, de manera que la resistencia mostrada por *E. coli* depende de los sistemas de emancipación de energía que emplean la fuerza protón motriz, componente esencial del pH, para transportar una amplia cantidad de moléculas anfifílicas. Debido a lo anterior, es muy probable que condiciones estresantes para las células de bacterias Gram (-), como el empleo de elevadas concentraciones de sal y pH ácido, desequilibren los sistemas reguladores de intercambio energético y ocasionen la sensibilidad observada ante la acción de las bacteriocinas.

El grupo de Simonetta *et al.*,(1997) trabajando con diversas cepas del género *Enterococcus* aisladas de leche y productos lácteos, encontraron que algunas de ellas tenían la capacidad de producir agentes inhibitorios con actividad frente a bacterias Gram- negativas, en específico, frente a especies de *Vibrio cholerae*.

Empleando los sobrenadantes crudos y concentrados de las especies con mayor actividad antagonista, determinaron que se trataba de cepas de *E. faecalis*, *E. durans* y *E. faecium* (principalmente). Dichos sobrenadantes fueron caracterizados en función de la estabilidad térmica bajo 100°C durante 10 y 30 min, encontrando que no se registró una disminución en la actividad inhibitoria registrada previamente frente a *V. cholerae*.

Por lo anteriormente expuesto, se podría inferir que los compuestos excretados por las BAL del queso Cotija, al presentar actividad antibacteriana en un amplio rango de pH, en presencia de NaCl y mostrar resistencia térmica podrían ser bacteriocinas.

También los resultados podrían indicar la presencia de compuestos con actividad antibacteriana diferentes, con características de especificidad que muestran una susceptibilidad variada ante la incubación a varias temperaturas. Sin embargo, habría que realizar una caracterización bioquímica de los compuestos excretados, para poder confirmar la naturaleza proteínica.

En el grupo de trabajo Delgado, E. (2009) realizó una purificación parcial de los sobrenadantes de las BAL con mayor actividad antibacteriana al realizar una precipitación al 40% con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Con lo anterior elaboró un perfil electroforético para estimar el tamaño de los compuestos presentes en dichos sobrenadantes. Los resultados preliminares indican la presencia de compuestos de origen proteínico, que al ser colocados sobre un cultivo sólido de *S. aureus*, presentan actividad antibacteriana frente al mismo.

7. CONCLUSIONES

- I. De las nueve cepas de BAL aisladas a partir del queso Cotija, únicamente las tres pertenecientes al género *Lactobacillus* y una del género *Enterococcus* ejercen un efecto antibacteriano sobre los microorganismos de interés alimentario, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.
- II. Ninguna de las cepas de BAL productoras de compuestos antibacterianos probadas tuvo efecto antibacteriano sobre los microorganismos:
 - ✦ Gram positivos: *Streptococcus sp.*, *L. innocua*, *L. lactis*, *M. lysodeikticus*, *P. pentosaceus*.
 - ✓ Parientes cercanos: *E. faecalis*, *E. faecium*, *L. pentosus*, *L. brevis* y *L. paracasei*.
 - ✦ Gram negativos: *Salmonella* serovar typhimurium,
- III. El hecho de encontrar actividad antibacteriana frente a microorganismos Gram negativos como *E. coli* resulta poco frecuente en los compuestos antibacterianos que hasta el momento se tienen reportados.
- IV. El efecto inhibitorio registrado por parte de los compuestos extracelulares de las BAL provenientes del queso Cotija, resulta importante debido a que tanto *E. coli* y *S. aureus* son microorganismos causantes de enfermedades transmitidas por el consumo de productos lácteos.
- V. Las cepas del género *Lactobacillus* demostraron ser las cepas con mayor producción de proteína extracelular, principalmente durante la fase estacionaria temprana de crecimiento y una marcada actividad antibacteriana.

VI. La caracterización realizada sobre las cepas de BAL pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* que mostraron la mayor actividad antibacteriana conllevó a establecer los siguientes criterios concluyentes:

Ⓢ El pH óptimo bajo el que se registro la actividad antibacteriana es único para cada cepa de BAL; y presenta un comportamiento variado con respecto al microorganismo indicador empleado.

Ⓢ Las cepas *L. paracasei* y *L. pentosus* presentan una preferencia para ejercer la mayor actividad antibacteriana a valores de pH de 5.0 y 6.0 respectivamente.

Ⓢ Por su parte, las cepas *L. brevis* y *E. faecalis* ejercen una mayor actividad antibacteriana bajo un pH de 7.0 y 8.0 respectivamente.

Ⓢ De lo anterior, se establece que las cepas de BAL caracterizadas presentan una actividad inhibitoria bajo un amplio espectro de pH que oscila entre los valores de 5.0 a 8.0; es decir, las sustancias antimicrobianas conservan su actividad y son estables al efecto del pH.

Ⓢ El efecto de la Fuerza Iónica (I) a través de la incorporación de sal en el medio de resuspensión de los sobrenadantes de las BAL aisladas del queso Cotija no contribuyó de manera importante sobre la actividad antibacteriana.

Ⓢ Bajo ninguna de las concentraciones de NaCl ensayadas, se presentó inhibición en la actividad inhibitoria; lo cual demuestra la estabilidad de los compuestos producidos por las BAL ante la presencia de sal.

Ⓢ Los compuestos extracelulares de cada BAL, presentan un comportamiento característico en la actividad antibacteriana que ejercen frente al microorganismo indicador empleado:

-
-
- ② Los compuestos de la cepa de *L. paracasei* presentan una preferencia para inhibir el crecimiento de *S. aureus* en ausencia de sal, mientras que para lograr la mayor inhibición de *E. coli* se la presencia de una concentración 2 M de NaCl fue requerida
 - ② Los compuestos de la cepa de *E. faecalis* registraron la mayor inhibición frente a *E. coli* al colocar en el medio una concentración salina 2 M, y con la ausencia de NaCl se registró la inhibición frente a *S. aureus*.
 - ② La actividad antibacteriana de los compuestos de la cepa de *L. brevis* frente a ambos microorganismos se presentó en presencia de una concentración 5.5 M de NaCl.
 - ② Los compuestos de la cepa de *L. pentosus* ejercieron la mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* bajo la presencia de una concentración de NaCl 2 M, mientras que para lograr la mayor actividad inhibitoria frente a *S. aureus* se necesitó de una concentración 5.5 M.
 - ② La estabilidad térmica que presentan los extractos celulares de las cuatro cepas de BAL es evidente, cabe destacar que al igual que en los otros ensayos de caracterización realizados, el comportamiento observado no es el mismo para cada una pues depende del microorganismo indicador sobre el que se este trabajando.
 - ② Los compuestos provenientes de la cepa de *L. paracasei* registraron la mayor actividad inhibitoria frente a *E. coli* bajo el calentamiento a 100°C durante 60 minutos. Para inhibir el crecimiento de *S. aureus* el calentamiento bajo el que se logró observar la mayor actividad antibacteriana fue de 120°C por 20 minutos.

-
-
- ④ La mayor actividad antibacteriana por parte de los compuestos de la cepa de *E. faecalis* se registraron bajo el tratamiento térmico de 100°C durante 60 minutos, frente a ambos microorganismos indicadores, *E. coli* y *S. aureus*.
 - ④ Los compuestos extracelulares de cepa de *L. brevis* frente a *E. coli* mostraron la mayor inhibición bajo el tratamiento de 100°C por 60 minutos, mientras que la condición de 120°C durante 20 minutos fue necesaria para lograr la mayor inhibición de *S. aureus*.
 - ④ Los compuestos antibacterianos de la cepa de *L. pentosus* mostraron la mayor actividad antibacteriana frente a *E. coli* bajo el calentamiento a 120°C durante 20 minutos, y la mayor inhibición frente a *S. aureus* se presentó al calentar a 100°C durante 60 minutos.
 - ④ En general, se presentó un aumento en la actividad antibacteriana al incrementar la severidad del tratamiento. Lo anterior indica que la actividad antimicrobiana está mediada por moléculas termorresistentes.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar la naturaleza de los compuestos extracelulares con actividad antibacteriana producidos por las cepas de BAL del queso Cotija, que conlleven a establecer el mecanismo de acción que permite visualizar el efecto inhibitorio antes descrito.

- Efectuar una caracterización bioquímica más detallada sobre los compuestos extracelulares producidos por las cepas de BAL del queso Cotija que presentaron actividad inhibitoria, que demuestren su posible naturaleza peptídica y semejanza con las bacteriocinas. Algunos de los ensayos a realizar pueden ser:
 - ✦ Actividad frente a proteasas
 - ✦ Resistencia contra detergentes
 - ✦ Determinar el peso molecular
 - ✦ Posible sinergia con agentes quelantes

- La búsqueda de una técnica de purificación que permita concentrar los compuestos con actividad antibacteriana excretada por las cepas de BAL aisladas del queso Cotija; sin que ésta afecte la actividad observada en los mismos.

9. ANEXO I

METODOLOGÍA

(Correspondiente a la sección 5. Metodología Experimental)

1. ESPECTRO DE INHIBICIÓN

1.1 Materiales y equipo

El material que se presenta a continuación es el requerido para efectuar el ensayo.

1.1.1 Reactivación de cepas de BAL

- Autoclave (Marca: Yamato, Mod. SM300)
- Campana de flujo laminar (Marca: Industrias Alder, S.A. de C.V)
- Microscopio (Marca: Olympus CX31RTSF Tokio, Japón)
- Incubadora estática a 37°C (Marca: Gravity Convection, Mod.E-71)
- 4 tubos de ensayo de 20 mL cada uno con 10 mL del medio MRS (Sección 1.2.1 de este apartado) estéril y rotulados
- 5 Tubos de ensayo de 20 mL, cada uno con 10 mL del medio APT (Sección 1.2.2 de este apartado) estéril y rotulados
- Portaobjetos
- Mechero bunsen
- Asas bacteriológicas

1.1.2 Cultivo en matraz (Fermentaciones)

- 4 matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, cada uno con 20mL de medio MRS (Sección 1.2.1 de este apartado) estéril y rotulados
- 5 matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, cada uno con 20 mL de medio APT (Sección 1.2.2 de este apartado) estéril; rotulados
- 10 matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL, cada uno con 100mL de medio APT (Sección 1.2.2 de este apartado) estéril; rotulados

-
-
- 8 matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL, cada uno con 100mL de medio MRS (Sección 1.2.1 de este apartado) estéril y rotulados
 - Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles
 - Incubadora a 37°C con agitación (Marca: New Brunswick Scientific, Mod. INNOVA 4000)

1.1.3 Obtención de sobrenadantes

- Centrifuga (Marca: BECKMAN; Mod.J2-MC)
- Vasos para centrifuga con capacidad de 250 mL

1.1.4 Concentración de sobrenadantes

- 18 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250mL
- Potenciómetro (Marca: BECKMAN; Mod. 34 pH METER HI 4211)
- 18 botes de plástico estériles
- Equipo de acero para microfiltración Millipore[®] el cual consiste en:
 - Vaso de acero estéril
 - Soporte para vaso
 - Pinzas pato para fijar el vaso
 - 18 membranas de 0.45 μ m
 - Pinzas para tomar las membranas
- Matraz Kitasato de 500 mL estéril
- Manguera látex para matraz Kitasato
- Equipo para liofilizar (Marca: LABCONCO, Freezer Dry System)
- Vasos para liofilizadora capacidades: 600 mL, 900 mL y 1200 mL.
- Alcohol al 70% para limpieza del equipo y superficies

1.1.5 Determinación de proteína

- 19 tubos de ensayo de 13x100
- Espectrofotómetro (Marca: Spectronic; Mod. 21D)
- Micropipeta de 1000 μ L y sus respectivas puntas

- Micropipeta de 10 μ L y sus respectivas puntas
- Micropipeta de 200 μ L y sus respectivas puntas

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

1.2 Reactivos

1.2.1 Medio MRS (De Man, Rogosa, Sharpe) (OXOID™)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Peptona	10.0
Polvo 'Lab- Lemco'	8.0
Extracto de levadura	4.0
Glucosa	20.0
Mono- oleato de sorbitán	1mL
Fosfato de hidrógeno di potásico	2.0
Acetato de sodio 3H ₂ O	5.0
Citrato triamónico	2.0
Sulfato de magnesio 7 H ₂ O	0.2
Sulfato de manganeso 4H ₂ O	0.05
pH 6.2 \pm 0.2	

PREPARACIÓN

Disolver 52 g en 1L de agua destilada. Mezclar hasta que este completamente disuelto. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

Nota 1: El medio modificado con 15% de glicerol se prepara de la misma forma antes descrita, añadiendo la cantidad correspondiente de glicerol.

Nota 2: Para preparar el medio base Agar MRS al 1%, se adicionan 10 g de Agar bacteriológico; y 8 g para obtener el medio suave al 0.8% se incorporan

1.2.2 Medio APT (Difco™)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades(g/L)
Extracto de levadura	7.5
Digerido pancreático de caseína	12.5
Dextrosa	10.0
Citrato de sodio	5.0
Clorhidrato de tiamina	0.001
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato dipotásico	5.0
Cloruro de manganeso	0.14
Sulfato de magnesio	0.8
Sulfato ferroso	0.04
Polisorbato 80 (Tween 80)	0.2
pH 6.7 ± 0.2	

PREPARACIÓN

Se disuelven 46.2 g en 1L de agua destilada. Mezclar bien. Caliente agitando frecuentemente y hierva durante 1 min para disolver completamente el polvo Esterilizar en autoclave: 15 min. a 121°C.

Nota 1: El medio modificado con 15% de glicerol se prepara de la misma forma antes descrita, añadiendo la cantidad correspondiente de glicerol.

Nota 2: Para preparar el medio base Agar APT al 1%, se adicionan 10 g de Agar bacteriológico; y 8 g para obtener el medio suave al 0.8% se incorporan

1.2.3 Kit para efectuar Tinción de Gram

1.2.4 Reactivo Bradford Marca: BIO-RAD®

1.3 Metodología

La metodología que a continuación se describe se realiza en la campana de flujo laminar.

1.3.1 Reactivación de cepas

- A. Descongelar los viales de cada una de las cepas a reactivar, los cuales se encuentran a -20°C , con ayuda de agua a temperatura ambiente para acelerar el proceso.
- B. Inocular en cada uno de los tubos de ensayo conteniendo el medio APT o MRS (de acuerdo con la cepa BAL correspondiente) de 2-3 perlas de vidrio con un asa bacteriológica en forma de gancho y esterilizada a la flama.
- C. Esterilizar el asa bacteriológica entre cada una de las siembras, permitiendo que ésta se enfríe previo a realizar la siguiente siembra.
- D. Incubar los tubos de ensayo en estático a una temperatura de 37°C durante 24 horas.
- E. Transcurrido el período de incubación, en un portaobjetos perfectamente limpio, colocar una muestra del medio óptimo de crecimiento de cada microorganismo con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada a la flama. Dejar secar las muestras depositadas.
- F. Fijar las muestras colocadas en los portaobjetos, pasándolos a través de la llama de un mechero bunsen.
- G. Efectuar para cada muestra una Tinción de Gram, empleando el kit adecuado para ello y siguiendo las indicaciones pertinentes.
- H. Analizar bajo el microscopio cada uno de los portaobjetos con el objetivo 100x ayudándose del aceite de inmersión para corroborar la pureza de las cepas en estudio.

1.3.2 Cultivo en matraz

Una vez que comprobada la pureza de las cepas de BAL, se procedió a efectuar el cultivo de las cepas puras siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

1.3.2.1 Preparación de preinóculos

- A. Colocar en cada matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, conteniendo 20mL del medio óptimo para cada microorganismo (*Tabla 73*), con ayuda de un asa bacteriológica en forma de gancho estéril, 3 perlas de vidrio perforadas (chaquiras) de la cepa en estudio correspondiente.
- B. Esterilizar el asa bacteriológica entre cada inoculación, dejando enfriarla previo a la siguiente siembra.
- C. Incubar cada uno de los preinóculos bajo las condiciones establecidas: temperatura de 37°C con agitación a una velocidad de 250 rpm por 24 h.

1.3.2.2 Inóculo

- A. Posteriormente en cada matraz Erlenmeyer de 500 mL, conteniendo 100 mL del medio apropiado (MRS o ATP), adicionar el 2% del preinoculo correspondiente a cada microorganismo.
- B. Incubar los matraces bajo las mismas condiciones citadas, deteniendo cada una de las fermentaciones una vez que se ha alcanzado la fase logarítmica tardía o estacionaria temprana de crecimiento para cada microorganismo (*Tabla 9*, Delgado, E. 2009).

1.3.3 Obtención de sobrenadantes

Nota: En los siguientes pasos el trabajo dentro de la campana de flujo laminar no es esencial.

-
-
- A. Colocar en vasos para centrifuga con capacidad de 250mL, los 100mL de cada una de las fermentaciones cosechadas (Fase logarítmica o Estacionaria Temprana).
 - B. Colocar en la centrifuga el rotor correspondiente al tamaño de los vasos, colocar la tapa del rotor y programar en el equipo las siguientes condiciones:
 - i. Rotor: J14
 - ii. Velocidad: 10 000 rpm
 - iii. Tiempo. 20 min
 - iv. Temperatura:4°C

1.3.4 Concentración de sobrenadantes

Concluida la centrifugación, decantar el sobrenadante en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, separándolo de la biomasa de cada fermentación.

1.3.4.1 Ajuste del pH

- A. Calibrar el potenciómetro con los buffers de referencia, de acuerdo con el intervalo de pH a trabajar.
- B. Enjuagar el electrodo previo a sumergirlo en cada una de las muestras, y secar con toallas de papel.
- C. Sumergir el electrodo en la muestra, registrar el pH de la misma.
- D. Ajustar el pH a un valor de 7.0 adicionando NaOH al 50% con ayuda de una pipeta Pasteur.

1.3.4.2 Filtrado de las muestras

Nuevamente es necesario trabajar bajo la campana de flujo laminar para evitar la contaminación de las muestras a partir de esta etapa.

-
-
- A. Llenar botes de plástico con capacidad aproximada de 50mL con agua a la mitad de su volumen, tapar (evitando cerrar por completo) y esterilizar en autoclave.
 - B. Decantar el contenido de los botes de plástico por completo.
 - C. Montar el equipo de micro filtración Millipore® como indica el fabricante, colocando con las pinzas una membrana de 0.45 μm .
 - D. Filtrar el sobrenadante con pH ajustado y recolectar el filtrado en los botes de plástico estériles y rotulados.
 - E. Colocar Parafilm® cubriendo la boca de cada bote antes de cerrar con su correspondiente tapa.

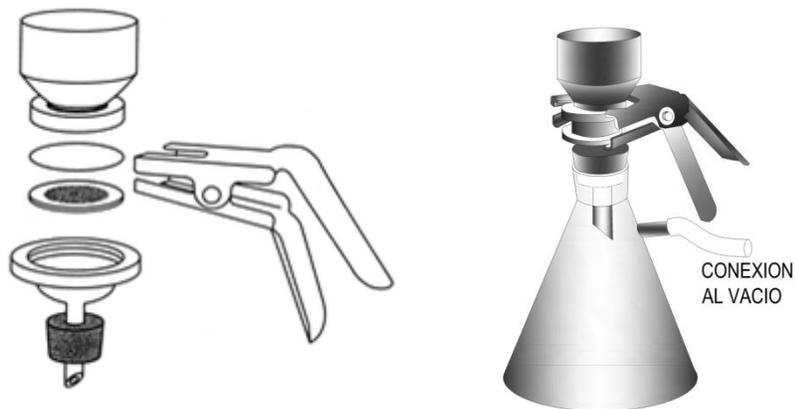


Figura 64: Partes que conforman el equipo de micro filtración Millipore®, montaje correcto del equipo.

1.3.4.3 Liofilización de los sobrenadantes

- A. Congelar cada una de las muestras filtradas y dejar a una temperatura de -70°C por espacio de 3h.
- B. Encender el equipo para liofilizar siguiendo las indicaciones del mismo.
- C. Alcanzado el vacío y temperatura adecuados, colocar las muestras dentro de los vasos para liofilizadora y conectar al equipo.
- D. Liofilizar las muestras hasta obtener un polvo completamente seco.
- E. Mantener las muestras liofilizadas a 4°C hasta su resuspensión en PBS 100 mM pH 7.0. (Dilución 10X).

1.3.5 Determinación de proteína

FUNDAMENTO: El acoplamiento del colorante Azul Brillante de Coomasie G-250 con la proteína, genera un complejo color azul-pardo que absorbe a una longitud de onda de 595 nm. Existe una relación directamente proporcional entre la intensidad del color y la concentración de proteína; de manera que ésta determinación es colorimétrica.

- A. Resuspender totalmente los sobrenadantes con 2.5 mL de PBS 100 mM pH 7.0.
- B. Efectuar una dilución 1:10 colocando 80 μ L de cada sobrenadante en 720 μ L de agua destilada.
- C. Tomar 8 μ L de la dilución anterior y colocar en un tubo de 13X100 con 782 μ L de agua destilada (dilución 1:100)
- D. Adicionar 200 μ L del reactivo de Bradford BIORAD a las diluciones 1:100 de cada sobrenadante y agitar para mezclar ambas soluciones.
- E. Preparar un blanco colocando 800 μ L de agua destilada y 200 μ L del reactivo de Bradford BIORAD.
- F. Leer las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de 595 nm en el espectro visible.
- G. Interpolar las absorbancias en la curva patrón de albúmina sérica bovina y determinar concentración de proteína para cada uno de los sobrenadantes cosechados de las cepas de BAL.

Curva patrón para determinación de proteína por Bradford

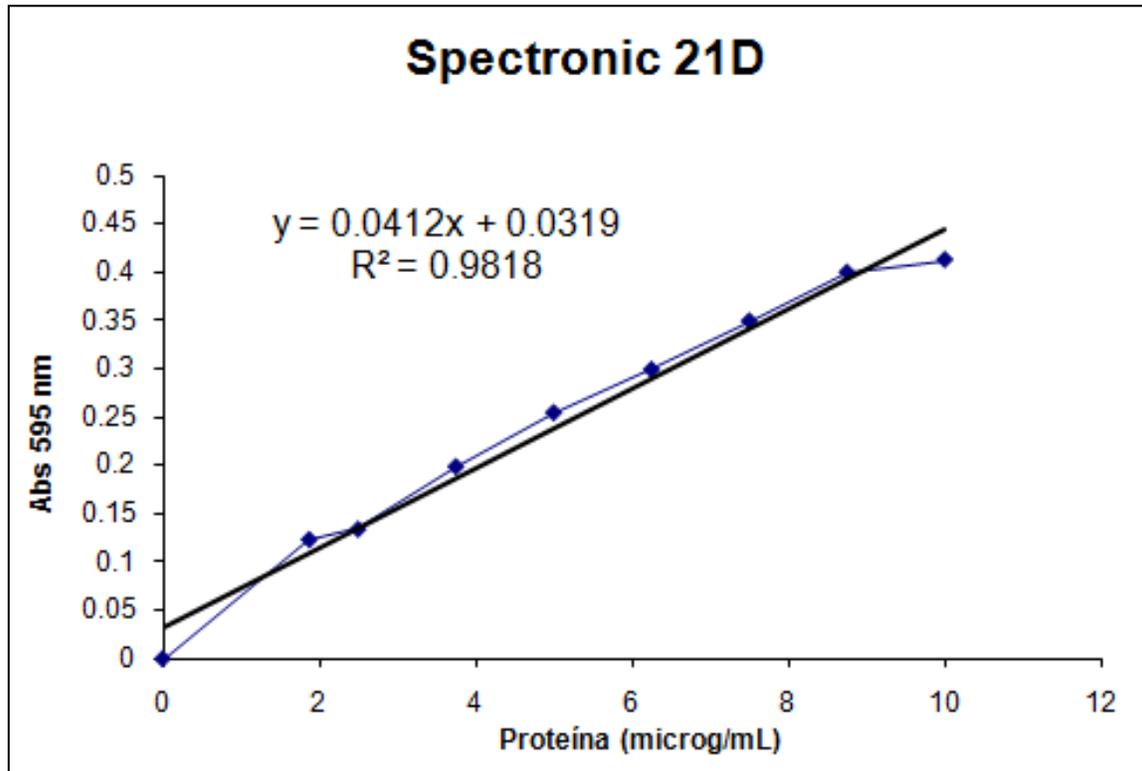


Figura 65: Curva patrón empleada para la determinación de proteína por la técnica de Bradford

2. TECNICAS PRESUNTIVAS POR DIFUSION EN AGAR

2.1 Materiales y equipo

El material listado a continuación es el requerido para efectuar el ensayo.

2.1.1 Reactivación de microorganismos indicadores y de importancia en salud

- 4 tubos de ensayo de 20 mL, cada uno con 10 mL del medio BHI estéril (Sección 2.2.1) y rotulados
- 1 tubo de ensayo de 20 mL conteniendo 10 mL de medio Luria estéril (Sección 2.2.2)
- 6 tubos de ensayo de 20 mL cada uno con 10 mL del medio MRS estéril (Sección 1.2.1) y rotulados
- 2 tubos de ensayo de 20 mL, cada uno con 10 mL del medio APT estéril (Sección 1.2.2) y rotulados
- Portaobjetos
- Mechero bunsen
- Asas bacteriológicas

2.1.2 Cultivo en matraz

- 4 matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, cada uno con 20mL de medio BHI (Sección 2.2.1) estéril y rotulados
- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, con 20 mL de medio Luria estéril (Sección 2.2.2)
- 6 matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, cada uno con 20 mL de medio MRS (Sección 1.2.1) estéril; rotulados
- 2 matraces Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, cada uno con 20mL de medio APT (Sección 1.2.2) estéril; rotulados

-
-
- 6 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio MRS (Sección 1.2.1) estéril; rotulados
 - 2 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50mL de medio APT (Sección 1.2.2) estéril; rotulados
 - 4 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50mL de medio BHI (Sección 2.2.1) estéril y rotulados
 - 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, con 50 mL de medio Luria estéril (Sección 2.2.2)
 - Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles

2.1.3 Realización de Césped bacteriano

- 78 tubos de ensayo de 20 mL conteniendo 9 mL de solución salina isotónica 0.85% estéril (Sección 2.2.3), rotulados en grupos de 6 tubos cada uno como dilución 10^{-1} a 10^{-6}
- 12 placas con medio Agar MRS estéril (Sección 1.2.1)
- 4 placas con medio Agar APT estéril (Sección 1.2.2)
- 8 placas con medio Agar BHI estéril (Sección 2.2.1)
- 2 placas con medio Agar Luria estéril (Sección 2.2.2)
- Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 20 μ L con sus respectivas puntas estériles
- Micropipeta de 5 mL con sus respectivas puntas estériles

2.1.4 Difusión en agar

- 20 tubos de ensayo de 20 mL conteniendo 9 mL de solución salina isotónica 0.85% estéril (Sección 2.2.3)
- 40 tubos de ensayo de 20 mL estériles
- 18 placas con 15 mL medio base Agar MRS estéril (Sección 1.2.1)
- 6 placas con 15 mL medio base Agar APT estéril (sección 1.2.2)

-
-
- 12 placas con 15 mL medio base Agar BHI estéril (Sección 2.2.1)
 - 3 placas con 15 mL medio base Agar Luria estéril (Sección 2.2.2)
 - 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 300 mL conteniendo 180 mL de medio suave Agar MRS al 0.8% estéril (Sección 1.2.1)
 - 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 125 mL conteniendo 60 mL de medio suave Agar APT al 0.8% estéril (Sección 1.2.2)
 - 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL conteniendo 120 mL de medio suave Agar BHI al 0.8% estéril (Sección 2.2.1)
 - 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 125 mL conteniendo 30 mL de medio suave Agar Luria al 0.8% estéril (Sección 2.2.2)
 - 4 probetas de 20mL estériles
 - Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles
 - Micropipeta de 20 μ L con sus respectivas puntas estériles

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

2.2 Reactivos

2.2.1 Medio BHI DIFCO™ (Infusión- Cerebro-Corazón)

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Cerebro de ternero, infusión de 200g	7.7
Corazón de buey, infusión de 250 g	9.8
Peptona de proteosa	10.0
Dextrosa	2.0
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato disódico	2.5
pH 7.4 ± 0.2	

PREPARACIÓN

Disolver 37 g en 1L de agua destilada. Mezclar hasta que este completamente disuelto. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

Nota: Para preparar el medio base Agar BHI al 1%, se adicionan 10 g/L de Agar bacteriológico; mientras que para obtener el medio suave al 0.8% se incorporan 8 g/L de agar.

2.2.2 Medio Luria

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Triptona	10.0
Cloruro de sodio	10.0
Extracto de levadura	5.0
pH 7.5 ± 0.2	

PREPARACIÓN

Disolver 25 g en 1L de agua destilada. Mezclar hasta que este completamente disuelto. Ajustar el pH del medio. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

Nota: Para preparar el medio base Agar Luria al 1%, se adicionan 10 g de Agar bacteriológico; mientras que para obtener el medio suave al 0.8% se incorporan 8 g de agar.

2.2.3 Solución Salina Isotónica 0.85%

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidades (g/L)
Cloruro de sodio	8.5
pH 7.0 ± 0.2	

PREPARACIÓN

Disolver en 1L de agua destilada, ajustar el pH. Esterilizar en autoclave 15 min. a 121°C.

2.3 Metodología

La metodología que a continuación se describe se realiza en la campana de flujo laminar.

2.3.1 Reactivación de microorganismos indicadores y de importancia en salud

2.3.1.1 Cepas de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* y *Salmonella typhimurium*

- A. Descongelar los viales de cada una de las cepas a reactivar que se encuentran almacenados a -20°C ; auxiliarse con agua a temperatura ambiente para acelerar el proceso.
- B. Inocular en cada uno de los tubos de ensayo conteniendo 10 mL de medio BHI (Infusión-Cerebro-Corazón) de 2-3 perlas de vidrio con un asa bacteriológica en forma de gancho y esterilizada a la flama.
- C. Esterilizar el asa bacteriológica entre cada una de las siembras, permitiendo que ésta se enfríe previo a realizar la siguiente siembra.
- D. Incubar los tubos de ensayo en estático a una temperatura de 37°C durante 24 horas.
- E. Transcurrido el período de incubación, en un portaobjetos perfectamente limpio, colocar una muestra del medio óptimo de crecimiento de cada microorganismo con ayuda de un asa bacteriológica esterilizada a la flama. Dejar secar las muestras depositadas.
- F. Fijar las muestras colocadas en los portaobjetos, pasándolos a través de la llama de un mechero bunsen.
- G. Efectuar para cada muestra una Tinción de Gram, empleando el kit adecuado para ello y siguiendo las indicaciones pertinentes.
- H. Analizar bajo el microscopio cada uno de los portaobjetos con el objetivo 100x ayudándose del aceite de inmersión para corroborar la pureza de las cepas en estudio.

2.3.1.2 Cepa de *Escherichia coli*

Se siguió el protocolo antes descrito, empleando como medio de cultivo caldo Luria.

2.3.1.3 Cepas de *Lactococcus lactis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Listeria innocua*, *Micrococcus lysodeikticus*

Efectuar el protocolo de reactivación empleando el medio de cultivo MRS.

2.3.1.4 Cepas de *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*

Seguir el protocolo de reactivación antes descrito empleando el medio de cultivo APT.

2.3.2 Cultivo en matraz

Una vez que comprobada la pureza de las cepas se realizó el cultivo de las cepas puras siguiendo el procedimiento que a continuación se describe:

2.3.2.1 Preparación de preinóculos

- A. Colocar en cada matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL, conteniendo 20mL del medio óptimo para cada microorganismo (*Tabla 8*), con ayuda de un asa bacteriológica en forma de gancho estéril, 3 perlas de vidrio perforadas (chaquiras) de la cepa en estudio correspondiente.
- B. Esterilizar el asa bacteriológica entre cada inoculación, dejando enfriarla previo a la siguiente siembra.
- C. Incubar cada uno de los preinóculos bajo las condiciones establecidas: temperatura de 37°C en estático por 24 h.

2.3.2.2 Inóculo

- A. Finalizado el espacio de 24 h, en cada matraz Erlenmeyer de 250 mL, conteniendo 50 mL del medio apropiado (BHI, APT, Luria o MRS), adicionar el 2% del preinóculo correspondiente a cada microorganismo.
- B. Incubar los matraces deteniendo cada una de las fermentaciones una vez que se ha alcanzado la fase logarítmica tardía de crecimiento para cada microorganismo (ver *Tabla 10*).

2.3.3 Césped bacteriano

2.3.3.1 Realización de diluciones decimales (10^{-1} hasta 10^{-6})

Finalizada la fermentación de cada microorganismo indicador (*Tablas 9 y 10*), efectuar diluciones decimales para cada una de las cepas; rotulando apropiadamente los tubos con el nombre del microorganismo y la dilución correspondiente comenzando con dilución 10^{-1} hasta la dilución 10^{-6} (*Figura 66*).

- A. Tomar 1 mL de la fermentación de cada microorganismo y colocarlo en el tubo etiquetado como dilución 10^{-1} conteniendo 9 mL de la solución salina isotónica. Agitar para homogeneizar la dilución.
- B. De la dilución anterior (10^{-1}) tomar 1 mL y colocarlo en el tubo rotulado como dilución 10^{-2} con 9 mL de solución salina isotónica. Agitar perfectamente la nueva dilución.
- C. Tomar 1 mL de la dilución 10^{-2} y colocarlo en un nuevo tubo conteniendo 9 mL de solución salina isotónica rotulado como dilución 10^{-3} . Agitar vigorosamente para homogeneizar la dilución.
- D. A partir de la dilución 10^{-3} retirar 1 mL de ésta y depositarlo en el tubo marcado como dilución 10^{-4} conteniendo 9 mL de solución salina isotónica. Agitar perfectamente.
- E. Extraer 1 mL de la dilución 10^{-4} y transferirlo a un tubo con 9 mL de solución salina isotónica rotulado como dilución 10^{-5} . Agitar para homogeneizar la dilución.

F. Finalmente de la dilución anterior (10^{-5}) tomar 1 mL para llevarlo a un nuevo tubo rotulado como dilución 10^{-6} conteniendo 9 mL de solución salina isotónica. Mezclar el contenido del tubo vigorosamente.

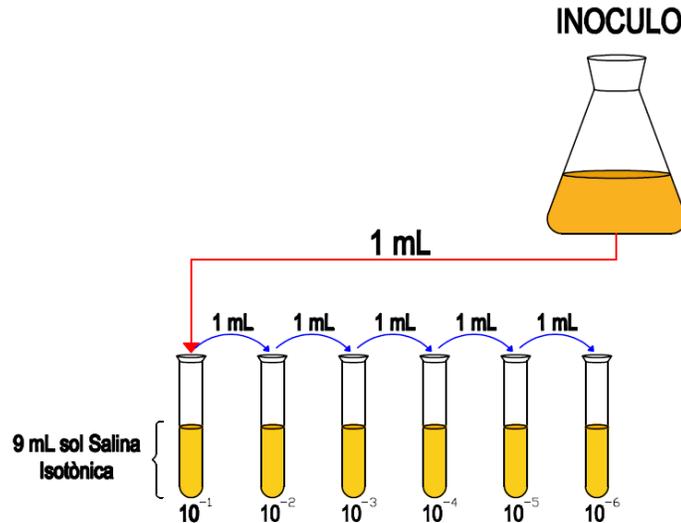


Figura 66: Diluciones decimales a partir del inoculo de cada microorganismo indicador a probar para la realización del Césped Bacteriano

2.3.3.2 Obtención de césped bacteriano

- A. Rotular por cada microorganismo 2 placas del medio sólido correspondiente (*Tabla 8*), dividir las en 3 sectores e identificar cada uno como dilución 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (placa 1); dilución 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} (placa 2) (*Figura 67*).
- B. Tomar el tubo rotulado como dilución 10^{-1} , agitar perfectamente el contenido. Con ayuda de una micropipeta, extraer 20 μ L de dicha dilución y colocarlos en el sector correspondiente de la placa (por triplicado).
- C. Proseguir el ensayo con las diluciones restantes (hasta dilución 10^{-6}), siguiendo el paso anterior.
- D. Permitir que las muestras colocadas sobre las placas se absorban y posteriormente incubar durante 24 h de acuerdo a las condiciones establecidas con anterioridad (*Tablas 9 y 10*).

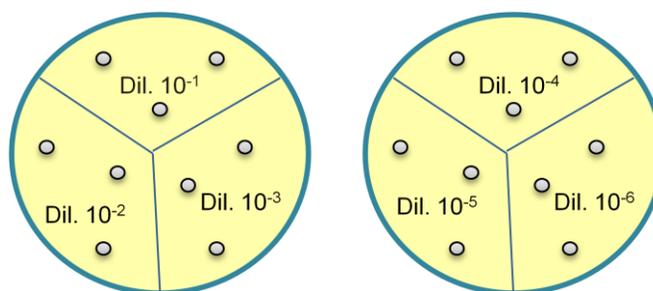


Figura 67: División en sectores de las placas con medio óptimo para la realización del césped bacteriano y colocación de las diluciones a probar

2.3.3.3 Selección de la dilución apropiada

Para todos los microorganismos indicadores, se selección como dilución de trabajo apropiada, aquella que presentaba mayor uniformidad en el césped bacteriano formado.

2.3.4 Técnica difusión en agar

Repetir la metodología anteriormente descrita en la sección 2.3.2 (apartados 2.3.2.1 y 2.3.2.2)

De acuerdo a los resultados mostrados en la *Tabla 13*, se efectuaron las diluciones decimales pertinentes para cada microorganismo indicador; siguiendo la metodología descrita en la sección 2.3.3.1 de este apartado.

- A. Rotular 3 placas con medio base apropiado (agar al 1%) para cada uno de los microorganismos indicadores (ver *Tablas 8* y *9*). Dividir cada placa a manera de obtener 6 secciones, identificar los sectores de la izquierda como Fase logarítmica y los de la derecha como Fase estacionaria (*Figura 68*).

-
-
- B. Colocar 10 mL de medio suave apropiado (agar al 0.8%) para cada microorganismo (ver *Tablas 8 y 9*) con ayuda de una probeta de 20 mL en tubos de ensayo estériles. Dejar enfriar a una temperatura aproximadamente de 40°C.
 - C. Tomar la dilución de trabajo seleccionada para cada microorganismo, agitar vigorosamente y extraer 20 µL de ella.
 - D. Depositar los 20 µL extraídos de la dilución, en el tubo con medio suave apropiado (por triplicado).
 - E. Verter el contenido de los tubos anteriores sobre cada una de las placas con medio base apropiado.
 - F. Efectuar seis movimientos a la derecha e izquierda, hacia arriba y abajo para cada placa.
 - G. Dejar solidificar las placas que han sido inoculadas con una sobre capa del microorganismo indicador apropiado para cada medio de cultivo.

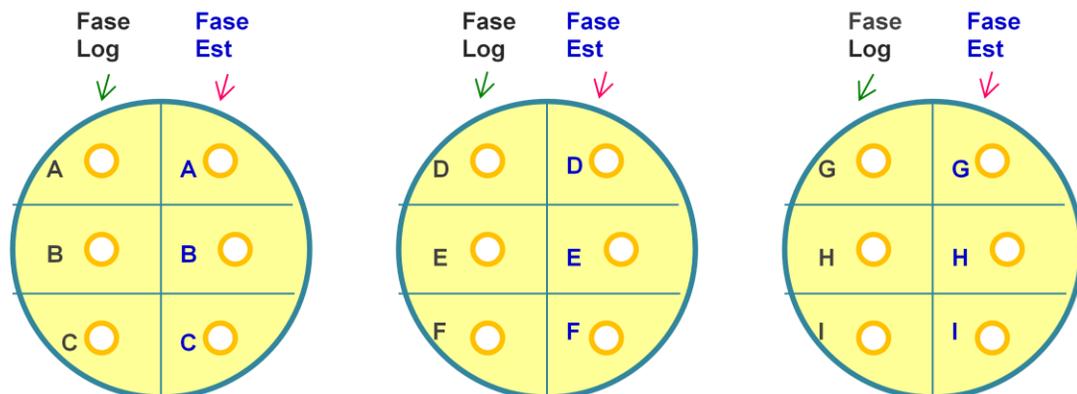


Figura 68: División en de placas para probar los sobrenadantes de las cepas de BAL en ambas fases de crecimiento: Técnica difusión en agar.

- H. Realizar pequeños pozos en las placas con ayuda de un cilindro de plástico de aproximadamente 9 mm de diámetro.
- I. Depositar en cada pozo 250 µL de cada uno de los sobrenadantes resuspendidos de las BAL a probar (Sección
- J. Incubar las placas durante 24-42h de acuerdo con las condiciones establecidas en la *Tabla 10*.

K. Finalizado el tiempo de incubación, medir los halos de inhibición obtenidos alrededor de los pozos para cada microorganismo indicador con ayuda de un Vernier.

3. CONSERVACIÓN DE CEPAS EN PERLAS DE VIDRIO PERFORADAS (CHAQUIRAS)

3.1 Materiales y equipo

3.1.1 Conservación de cepas de BAL

- 20 viales con capacidad de 1.8 mL con chaquiras estériles
- 2 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio MRS (Sección 1.2.1)
- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 50mL, con 25 mL de medio MRS+ 15% glicerol estéril (Sección 1.2.1)
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de agua peptona al 0.1% pH 7.0 (Sección 3.2.1)
- 4 tubos Falcon de 50 mL estériles, para centrifuga Centra CL2
- Micropipeta de 1000 µL con sus respectivas puntas estériles

3.1.2 Conservación de cepas indicadoras

- 60 viales con capacidad de 1.8 mL con chaquiras estériles
- 3 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio MRS (Sección 1.2.1)
- 2 matraces Erlenmeyer con capacidad de 250 mL, cada uno con 50 mL de medio BHI (Sección 2.2.1)
- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 250 mL con 50 mL de medio Luria (Sección 2.2.2)
- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 125mL, con 35 mL de medio MRS+ 15% glicerol estéril (Sección 1.2.1)
- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL conteniendo 25 mL de medio BHI + 15% glicerol (Sección 2.2.1)

- 1 matraz Erlenmeyer con capacidad de 50 mL conteniendo 20 mL de medio Luria + 15% glicerol ((Sección 2.2.2)
- 1 matraz Erlenmeyer de 250 mL, con 100 mL de agua peptona al 0.1% pH 7.0 (Sección 3.2.1)
- 12 tubos Falcon de 50 mL estériles, para centrifuga Centra CL2
- Micropipeta de 1000 μ L con sus respectivas puntas estériles

Nota: El material indicado como estéril, se esterilizó en autoclave a 121°C durante 15 min.

3.2 Reactivos

3.2.1 Agua peptona

COMPOSICIÓN

Ingredientes	Cantidad g/L
Peptona	1.0
pH 7.0 \pm 0.2	

PREPARACIÓN

Se disuelve 1.0 g en 1L de agua destilada. Ajustar el pH y esterilizar en autoclave: 15 min. a 121°C.

3.3 Metodología

La metodología que a continuación se describe se realiza en la campana de flujo laminar.

3.3.1 Conservación de cepas de BAL

Seguir la metodología descrita en la sección 1.3.2 (apartados 1.3.2.1 y 1.3.2.2)

-
-
- A. Finalizada la fermentación de cada una de las cepas de BAL, dividirla en dos tubos Falcon de 50 mL
 - B. Centrifugar a 8, 500 rpm durante 15 min a 4°C.
 - C. Desechar el sobrenadante.
 - D. Resuspender los botones obtenidos en 15 mL de agua peptona y trasvasar el contenido a un solo tubo Falcon (del mismo microorganismo)
 - E. Centrifugar nuevamente los botones a 8, 500 rpm durante 15min a 4°C.
 - F. Eliminar el sobrenadante (residuos del medio de cultivo)
 - G. Repetir nuevamente el procedimiento desde el paso D.
 - H. Resuspender los botones en 10 mL del medio de cultivo óptimo con 15% de glicerol como agente criogénico.
 - I. Agitar vigorosamente los botones (vortex) para disolver perfectamente la biomasa.
 - J. Tomar 1 mL de la biomasa resuspendida y verter en cada uno de los viales (previamente rotulados con el nombre de la cepa de BAL), cubriendo por completo las perlas de vidrio perforadas con el medio de cultivo.
 - K. Conservar los viales a -20°C.

3.3.2 Conservación de cepas indicadoras

Repetir la metodología anteriormente descrita en la sección 2.3.2 (apartados 2.3.2.1 y 2.3.2.2)

- A. Concluida la fermentación de cada uno de los microorganismos indicadores, dividirla en dos tubos Falcon de 50 mL (25 mL de la fermentación en cada uno).
- B. Seguir el protocolo de la Sección 3.3.1 a partir del inciso B.

10. ANEXO II

Resultados

(Correspondiente a la sección 6)

CARACTERIZACIÓN DE LOS SOBRENADANTES DE LAS CEPAS DE BAL (Correspondiente a la sección 6.3)

A. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de las cepas de BAL aisladas del queso Cotija

Tabla 1. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Lactobacillus paracasei* sobre *S. aureus*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/mg	
4	12.67	1.105	11.5	12.00	1.105	10.9	8.33	0.244	34.2	18.8
5	13.67	1.105	12.4	13.67	1.105	12.4	15.67	0.244	64.3	29.7
6	12.33	1.105	11.2	13.00	1.105	11.8	12.33	0.244	50.6	24.5
7	12.67	1.105	11.5	11.33	1.105	10.3	12.00	0.244	49.3	23.7
8	10.00	1.105	9.0	10.00	1.105	9.0	9.33	0.244	38.3	18.8
9	8.00	1.105	7.2	8.00	1.105	7.2	10.00	0.244	41.1	18.5
10	13.00	1.105	11.8	7.33	1.105	6.6	6.00	0.244	24.6	14.3

Tabla 2. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	63.5
5	100.0
6	82.6
7	79.7
8	63.4
9	62.4
10	48.3

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *L. paracasei* sobre *E. coli*

Tabla 3. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de <i>Lactobacillus paracasei</i> sobre <i>E. coli</i>										
pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición /mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	7.33	1.105	6.6	6.00	1.105	5.4	6.33	0.244	26.0	12.7
5	8.33	1.105	7.5	7.67	1.105	6.9	7.33	0.244	30.1	14.9
6	7.00	1.105	6.3	6.67	1.105	6.0	6.67	0.244	27.4	13.2
7	5.00	1.105	4.5	5.67	1.105	5.1	6.00	0.244	24.6	11.4
8	3.33	1.105	3.0	3.33	1.105	3.0	5.67	0.244	23.3	9.8
9	2.33	1.105	2.1	2.33	1.105	2.1	4.33	0.244	17.8	7.3
10	2.67	1.105	2.4	1.67	1.105	1.5	3.67	0.244	15.1	6.3

Tabla 4. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de <i>L. paracasei</i> sobre <i>E. coli</i>	
pH	% Actividad Específica Relativa
4	85.4
5	100.0
6	89.1
7	76.9
8	65.7
9	49.4
10	42.6

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* sobre *S. aureus*

Tabla 5. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* sobre *S. aureus*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	7.33	0.878	8.4	10.67	0.878	12.1	11.00	0.238	46.2	22.2
5	10.67	0.878	12.1	12.33	0.878	14.0	11.33	0.238	47.6	24.6
6	11.33	0.878	12.9	14.00	0.878	15.9	12.33	0.238	51.8	26.9
7	10.67	0.878	12.1	11.00	0.878	12.5	12.33	0.238	51.8	25.5
8	12.00	0.878	13.7	8.00	0.878	9.1	16.33	0.238	68.6	30.5
9	8.00	0.878	9.1	6.00	0.878	6.8	10.33	0.238	43.4	19.8
10	13.33	0.878	15.2	5.33	0.878	6.1	8.33	0.238	35.0	18.8

Tabla 6. Efecto del pH : Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	73.0
5	80.8
6	88.3
7	83.7
8	100.0
9	64.9
10	61.6

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* sobre *E. coli*

Tabla 7. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Enterococcus faecalis* sobre *E. coli*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	8.33	0.878	9.5	7.67	0.878	8.7	8.67	0.238	36.4	18.2
5	9.00	0.878	10.3	8.67	0.878	9.9	8.00	0.238	33.6	17.9
6	7.00	0.878	8.0	6.67	0.878	7.6	7.00	0.238	29.4	15.0
7	5.00	0.878	5.7	5.67	0.878	6.5	6.00	0.238	25.2	12.5
8	14.33	0.878	16.3	15.00	0.878	17.1	11.67	0.238	49.0	27.5
9	10.66	0.878	12.1	11.33	0.878	12.9	7.67	0.238	32.2	19.1
10	9.33	0.878	10.6	9.67	0.878	11.0	7.33	0.238	30.8	17.5

Tabla 8. Efecto del pH : Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *E. coli*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	66.3
5	65.2
6	54.6
7	45.3
8	100.0
9	69.5
10	63.6

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *L. brevis* sobre *S. aureus*

Tabla 9. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Lactobacillus brevis* sobre *S. aureus*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	14.33	0.312	45.9	13.67	0.312	43.8	6.00	0.175	34.3	41.4
5	15.67	0.312	50.2	14.33	0.312	45.9	6.67	0.175	38.2	44.8
6	15.00	0.312	48.1	15.67	0.312	50.2	7.67	0.175	43.9	47.4
7	17.00	0.312	54.5	17.33	0.312	55.6	13.00	0.175	74.4	61.5
8	10.33	0.312	33.1	14.67	0.312	47.0	6.33	0.175	36.3	38.8
9	13.00	0.312	41.7	12.33	0.312	39.5	5.00	0.175	28.6	36.6
10	11.00	0.312	35.3	11.33	0.312	36.3	5.33	0.175	30.5	34.0

Tabla 10. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *S. aureus*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	67.3
5	72.8
6	77.1
7	100.0
8	63.1
9	59.5
10	55.4

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *L. brevis* sobre *E. coli*

Tabla 11. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Lactobacillus brevis* sobre *E. coli*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	9.33	0.312	29.9	8.67	0.312	27.8	9.33	0.175	53.4	37.0
5	7.66	0.312	24.6	6.67	0.312	21.4	8.33	0.175	47.7	31.2
6	10.00	0.312	32.1	9.00	0.312	28.8	9.00	0.175	51.5	37.5
7	10.66	0.312	34.2	11.00	0.312	35.3	11.67	0.175	66.8	45.4
8	9.66	0.312	31.0	9.33	0.312	29.9	10.33	0.175	59.2	40.0
9	9.00	0.312	28.8	8.33	0.312	26.7	10.00	0.175	57.2	37.6
10	7.66	0.312	24.6	7.00	0.312	22.4	9.00	0.175	51.5	32.8

Tabla 12. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *E. coli*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	81.6
5	68.7
6	82.5
7	100.0
8	88.1
9	82.8
10	72.3

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

Tabla 13. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Lactobacillus pentosus* sobre *S. aureus*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	8.33	0.785	10.6	9	0.785	11.5	5.67	0.264	21.5	14.5
5	10.66	0.785	13.6	9.67	0.785	12.3	8.00	0.264	30.3	18.7
6	10.66	0.785	13.6	12.33	0.785	15.7	9.33	0.264	35.4	21.6
7	6.66	0.785	8.5	10.33	0.785	13.2	7.00	0.264	26.5	16.1
8	9.00	0.785	11.5	6.33	0.785	8.1	8.00	0.264	30.3	16.6
9	9.33	0.785	11.9	5.67	0.785	7.2	5.33	0.264	20.2	13.1
10	5.33	0.785	6.8	3.0	0.785	3.8	5.00	0.264	18.9	9.9

Tabla 14. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	67.4
5	86.9
6	100.0
7	74.5
8	77.1
9	60.8
10	45.7

Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *L. pentosus* sobre *E. coli*

Tabla 15. Efecto del pH sobre la actividad antibacteriana de *Lactobacillus pentosus* sobre *E. coli*

pH	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4	8.66	0.785	11.0	6.67	0.785	8.5	8.00	0.264	30.3	16.6
5	7.66	0.785	9.8	7.67	0.785	9.8	7.00	0.264	26.5	15.4
6	4.33	0.785	5.5	8.33	0.785	10.6	11.33	0.264	42.9	19.7
7	9.33	0.785	11.9	7.00	0.785	8.9	8.67	0.264	32.8	17.9
8	5.66	0.785	7.2	6.00	0.785	7.6	7.00	0.264	26.5	13.8
9	5.33	0.785	6.8	5.00	0.785	6.4	6.33	0.264	24.0	12.4
10	3.33	0.785	4.2	4.67	0.785	5.9	5.67	0.264	21.5	10.6

Tabla 16. Efecto del pH: Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *E. coli*

pH	%Actividad Específica Relativa
4	84.4
5	78.0
6	100.0
7	90.8
8	70.1
9	62.9
10	53.6

B. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de las BAL

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

Tabla 17. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. paracasei* frente a *S. aureus*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	18.33	0.175	104.6	26.00	0.175	148.6	21.00	0.244	86.2	113.1
2.0	15.33	0.175	87.5	20.67	0.175	118.1	14.33	0.244	58.8	88.2
5.5	17.67	0.175	100.8	24.33	0.175	139.0	18.00	0.244	73.9	104.6

Tabla 18. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	100.0
2.0	77.9
5.5	92.4

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. paracasei* frente a *E. coli*

Tabla 19. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. paracasei* frente a *E. coli*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	12.00	0.175	68.5	24.67	0.175	140.8	24.00	0.244	98.5	102.6
2.0	12.67	0.175	72.3	26.33	0.175	150.3	25.33	0.244	104.0	108.9
5.5	12.33	0.175	70.4	25.67	0.175	146.5	26.33	0.244	108.1	108.3

Tabla 20. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *E. coli*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	94.7
2.0	100.0
5.5	99.5

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

Tabla 21. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *E. faecalis* frente a *S. aureus*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	17.67	0.191	92.3	26.67	0.191	139.3	22.67	0.238	95.3	109.0
2.0	16.67	0.191	87.1	25.67	0.191	134.1	23.67	0.238	99.5	106.9
5.5	14.33	0.191	74.9	27.00	0.191	141.1	25.33	0.238	106.5	107.5

Tabla 22. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	100
2.0	98.1
5.5	98.6

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *E. faecalis* frente a *E. coli*

Tabla 23. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *E. faecalis* frente a *E. coli*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	11.00	0.191	57.5	25.67	0.191	134.1	24.33	0.238	102.3	98.0
2.0	13.00	0.191	67.9	26.67	0.191	139.3	25.33	0.238	106.5	104.6
5.5	15.00	0.191	78.4	24.33	0.191	127.2	23.67	0.238	99.5	101.7

Tabla 24. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *E. coli*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	93.7
2.0	100.0
5.5	97.2

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. brevis* frente a *S. aureus*

Tabla 25. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. brevis* frente a *S. aureus*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición / mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	16.33	0.217	75.4	26.33	0.217	121.5	18.33	0.175	105.0	100.6
2.0	16.00	0.217	73.8	24.33	0.217	112.3	17.67	0.175	101.1	95.7
5.5	18.67	0.217	86.1	25.33	0.217	116.9	20.00	0.175	114.5	105.8

Tabla 26. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *S. aureus*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	95.1
2.0	90.5
5.5	100.0

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. brevis* frente a *E. coli*

Tabla 27. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. brevis* frente a *E. coli*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición / mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0				25.67	0.217	118.4	23.33	0.175	133.6	126.0
2.0				24.67	0.217	113.8	22.67	0.175	129.8	121.8
5.5	NO SE REGISTRÓ INHIBICION			25.67	0.217	118.4	24.33	0.175	139.3	128.9

Tabla 28. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *E. coli*

[NaCl] M	%Actividad Específica Relativa
0	97.8
2.0	94.5
5.5	100.0

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

Tabla 29. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. pentosus* frente a *S. aureus*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición / mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	13.33	0.241	55.4	24.00	0.241	99.7	15.00	0.264	85.9	80.3
2.0	18.00	0.241	74.8	15.33	0.241	63.7	16.00	0.264	91.6	76.7
5.5	17.00	0.241	70.6	18.33	0.241	76.1	18.00	0.264	103.0	83.3

Tabla 30. Fuerza Iónica: Actividad Especifica Relativa de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

[NaCl] M	%Actividad Relativa
0	96.4
2.0	92.1
5.5	100.0

Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad de *L. pentosus* frente a *E. coli*

Tabla 31. Efecto de la Fuerza Iónica sobre la actividad antibacteriana de *L. pentosus* frente a *E. coli*

[NaCl] (M)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición / mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
0	11.67	0.241	48.5	27.67	0.241	114.9	21	0.264	79.6	81.0
2.0	11.67	0.241	48.5	28.00	0.241	116.3	21.33	0.264	80.8	81.9
5.5	13.67	0.241	56.8	20.67	0.241	85.8	22.33	0.264	84.6	75.7

Tabla 32. Fuerza Iónica: Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *E. coli*

[NaCl] M	%Actividad Relativa
0	98.9
2.0	100.0
5.5	92.5

C. Efecto de la temperatura sobre los compuestos antibacterianos de las BAL

Efecto de la temperatura de los SN de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

Tabla 33. Efecto de la temperatura de los SN de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	16.00	1.105	14.5	11.00	1.105	10.0	13.00	0.175	74.2	32.9
10°/20'	14.67	1.105	13.3	9.00	1.105	8.1	13.33	0.175	76.1	32.5
20°/20'	17.67	1.105	16.0	13.67	1.105	12.4	14.00	0.175	79.9	36.1
30°/20'	18.33	1.105	16.6	11.67	1.105	10.6	15.00	0.175	85.6	37.6
37°/20'	17.00	1.105	15.4	12.00	1.105	10.9	14.00	0.175	79.9	35.4
100°/ 5'	14.33	0.175	81.8	21.33	0.175	121.8	14.33	0.175	81.8	95.1
100°/20'	13.67	0.175	78.0	17.67	0.175	100.8	19.00	0.175	108.4	95.8
100°/60'	15.00	0.175	85.6	19.33	0.175	110.4	17.00	0.175	97.0	97.7
120°/ 20'	-----	-----	-----	21.33	0.175	121.8	15.33	0.175	87.5	104.6

Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

Tabla 34. Efecto de la Temperatura: Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *S. aureus*

Relación T/t (°C/ min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	31.4
10°/20'	31.1
20°/20'	34.5
30°/20'	35.9
37°/20'	33.8
60°/20'	89.1
100°/5'	90.9
100°/20'	91.5
100°/60'	93.3
120°/20'	100.0

Efecto de la temperatura de los SN de *L. paracasei* sobre *E. coli*

Tabla 35. Efecto de la temperatura de los SN de *L. paracasei* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	14.33	1.105	13.0	13	1.105	11.8	13.33	0.175	76.1	33.6
10°/20'	12.33	1.105	11.2	13.67	1.105	12.4	16.00	0.175	91.3	38.3
20°/20'	13.33	1.105	12.1	15	1.105	13.6	12.67	0.175	72.3	32.6
30°/20'	13.67	1.105	12.4	14	1.105	12.7	12.33	0.175	70.4	31.8
37°/20'	13.00	1.105	11.8	14.67	1.105	13.3	15.33	0.175	87.5	37.5
60°/ 20'	11.00	0.175	62.8	21.67	0.175	123.7	23.33	0.175	133.2	106.5
100°/ 5'	13.33	0.175	76.1	22.00	0.175	125.6	21.00	0.175	119.9	107.2
100°/20'	13.67	0.175	78.0	24.00	0.175	137.0	21.67	0.175	123.7	112.9
100°/60'	17.00	0.175	97.0	21.00	0.175	119.9	24.00	0.175	137.0	118.0
120°/ 20'	-----	-----	-----	24.67	0.175	140.8	19.00	0.175	108.4	124.6

Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *E. coli*

Tabla 36. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de *L. paracasei* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	27.0
10°/20'	30.7
20°/20'	26.2
30°/20'	25.5
37°/20'	30.1
60°/20'	85.5
100°/5'	86.0
100°/20'	90.6
100°/60'	94.7
120°/20'	100.0

Efecto de la temperatura de los SN de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

Tabla 37. Efecto de la temperatura de los SN de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición /mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	16.00	0.878	18.2	10.67	0.878	12.1	16.00	0.191	83.6	38.0
10°/20'	12.33	0.878	14.0	11.33	0.878	12.9	14.33	0.191	74.9	34.0
20°/20'	15.67	0.878	17.8	13.33	0.878	15.2	17.67	0.191	92.3	41.8
30°/20'	16.67	0.878	19.0	14.33	0.878	16.3	16.00	0.191	83.6	39.6
37°/20'	13.33	0.878	15.2	12.00	0.878	13.7	17.00	0.191	88.8	39.2
60°/ 20'	12.33	0.191	64.4	17.33	0.191	90.6	11	0.191	57.5	70.8
100°/ 5'	13.67	0.191	71.4	17.00	0.191	88.8	14	0.191	73.2	77.8
100°/20'	12.33	0.191	64.4	16.67	0.191	87.1	14	0.191	73.2	74.9
100°/60'	18.00	0.191	94.1	20.67	0.191	108.0	19.00	0.191	99.3	100.4
120°/ 20'	-----	-----	-----	17.33	0.191	90.6	14.00	0.191	73.2	81.9

Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

Tabla 38. Efecto de la temperatura: Actividad Especifica Relativa de *E. faecalis* sobre *S. aureus*

Relación T/t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	37.8
10°/20'	33.8
20°/20'	41.6
30°/20'	39.5
37°/20'	39.1
60°/20'	70.5
100°/5'	77.5
100°/20'	74.6
100°/60'	100.0
120°/20'	81.5

Efecto de la temperatura de los SN de *E. faecalis* sobre *E. coli*

Tabla 39. Efecto de la temperatura de los SN de *E. faecalis* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	15.00	0.878	17.1	15.33	0.878	17.5	14.67	0.191	76.6	37.1
10°/20'	13.67	0.878	15.6	17.00	0.878	19.4	17.33	0.191	90.6	41.8
20°/20'	15.33	0.878	17.5	14.33	0.878	16.3	16.67	0.191	87.1	40.3
30°/20'	15.00	0.878	17.1	16.33	0.878	18.6	17.67	0.191	92.3	42.7
37°/20'	15.00	0.878	17.1	17.00	0.878	19.4	16.00	0.191	83.6	40.0
60°/20'	11.00	0.191	57.5	23.33	0.191	121.9	22.33	0.191	116.7	98.7
100°/5'	11.33	0.191	59.2	22.00	0.191	115.0	20.00	0.191	104.5	92.9
100°/20'	11.67	0.191	61.0	24.33	0.191	127.2	20.67	0.191	108.0	98.7
100°/60'	13.67	0.191	71.4	26.67	0.191	139.3	25.33	0.191	132.4	114.4
120°/20'	-----	-----	-----	21.33	0.191	111.5	23.00	0.191	120.2	115.8

Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *E. coli*

Tabla 40. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de *E. faecalis* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	32.0
10°/20'	36.1
20°/20'	34.8
30°/20'	36.8
37°/20'	34.5
60°/20'	85.2
100°/5'	80.2
100°/20'	85.2
100°/60'	98.7
120°/20'	100.0

Efecto de la temperatura de los SN de *L. brevis* sobre *S. aureus*

Tabla 41. Efecto de la temperatura de los SN de *L. brevis* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	11.67	0.312	37.4	13	0.312	41.7	16.00	0.217	73.82	51.0
10°/20'	13.67	0.312	43.8	10.3	0.312	33.1	14.33	0.217	66.13	47.7
20°/20'	13.00	0.312	41.7	10.7	0.312	34.2	17.33	0.217	79.97	51.9
30°/20'	15.00	0.312	48.1	10	0.312	32.1	18.33	0.217	84.58	54.9
37°/20'	14.33	0.312	45.9	9.3	0.312	29.9	15.33	0.217	70.74	48.9
60°/20'	16.67	0.217	76.9	16.00	0.217	73.8	15.33	0.217	70.7	73.8
100°/5'	15.67	0.217	72.3	15.30	0.217	70.6	13	0.217	60.0	67.6
100°/20'	13.33	0.217	61.5	17.00	0.217	78.4	13.33	0.217	61.5	67.2
100°/60'	16.00	0.217	73.8	16.67	0.217	76.9	16.33	0.217	75.4	75.4
120°/20'	-----	-----	-----	17.33	0.217	80.0	16.00	0.217	73.8	76.9

Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *S. aureus*

Tabla 42. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	66.3
10°/20'	62.0
20°/20'	67.5
30°/20'	71.4
37°/20'	63.5
60°/20'	96.0
100°/5'	87.9
100°/20'	87.3
100°/60'	98.0
120°/20'	100.0

Efecto de la temperatura de los SN de *L. brevis* sobre *E. coli*

Tabla 43. Efecto de la temperatura de los SN de *L. brevis* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	12.33	0.312	39.5	14.33	0.312	45.9	23.00	0.217	106.1	63.9
10°/20'	12.67	0.312	40.6	14.00	0.312	44.9	24.00	0.217	110.7	65.4
20°/20'	14.33	0.312	45.9	15.33	0.312	49.1	20.33	0.217	93.8	63.0
30°/20'	15.67	0.312	50.2	14.33	0.312	45.9	21.00	0.217	96.9	64.3
37°/20'	14.00	0.312	44.9	16.33	0.312	52.4	19.67	0.217	90.7	62.7
60°/20'	11.33	0.217	52.3	21.67	0.217	100.0	21.00	0.217	96.9	83.0
100°/5'	12.33	0.217	56.9	24.67	0.217	113.8	22.33	0.217	103.0	91.2
100°/20'	11.33	0.217	52.3	23.67	0.217	109.2	23.67	0.217	109.2	90.2
100°/60'	16.67	0.217	76.9	22.67	0.217	104.6	24.33	0.217	112.3	97.9
120°/20'	----	----	----	16.00	0.217	73.8	20.33	0.217	93.8	83.8

Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *E. coli*

Tabla 44. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de *L. brevis* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	65.2
10°/20'	66.8
20°/20'	64.3
30°/20'	65.7
37°/20'	64.0
60°/20'	84.8
100°/5'	93.2
100°/20'	92.1
100°/60'	100.0
120°/20'	85.6

Efecto de la temperatura de los SN de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

Tabla 45. Efecto de la temperatura de los SN de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	11.33	0.785	14.4	10.33	0.785	13.2	16.00	0.241	66.5	31.4
10°/20'	11.33	0.785	14.4	9.67	0.785	12.3	11.33	0.241	47.1	24.6
20°/20'	10.33	0.785	13.2	8.33	0.785	10.6	13.67	0.241	56.8	26.8
30°/20'	9.67	0.785	12.3	10	0.785	12.7	18.33	0.241	76.1	33.7
37°/20'	10.67	0.785	13.6	10	0.785	12.7	16.67	0.241	69.2	31.9
60°/20'	14.33	0.241	59.5	9.67	0.241	40.1	16.00	0.241	66.5	55.4
100°/5'	13.67	0.241	56.8	8.33	0.241	34.6	11.33	0.241	47.1	46.1
100°/20'	13.67	0.241	56.8	8.00	0.241	33.2	13.67	0.241	56.8	48.9
100°/60'	15.33	0.241	63.7	15.67	0.241	65.1	18.33	0.241	76.1	68.3
120°/20'	----	----	----	9.67	0.241	40.1	16.67	0.241	69.2	54.7

Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

Tabla 46. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *S. aureus*

Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	45.9
10°/20'	36.0
20°/20'	39.3
30°/20'	49.4
37°/20'	46.6
60°/20'	81.1
100°/5'	67.6
100°/20'	71.6
100°/60'	100.0
120°/20'	80.1

Efecto de la temperatura de los SN de *L. pentosus* sobre *E. coli*

Tabla 47. Efecto de la temperatura de los SN de *L. pentosus* sobre *E. coli*

Relación T / t (°C/min)	Primero Ensayo			Segundo Ensayo			Tercer Ensayo			Actividad (mm inhibición/ mg proteína)
	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	Promedio mm Inh.	[Proteína] (mg)	Actividad mm/ mg	
4°/20'	13.33	0.785	17.0	14.33	0.785	18.3	17.00	0.241	70.6	35.3
10°/20'	12.33	0.785	15.7	16.67	0.785	21.2	17.33	0.241	72.0	36.3
20°/20'	12.67	0.785	16.1	15.33	0.785	19.5	17.00	0.241	70.6	35.4
30°/20'	12.00	0.785	15.3	15.67	0.785	20.0	21.00	0.241	87.2	40.8
37°/20'	14.67	0.785	18.7	15.67	0.785	20.0	21.67	0.241	90.0	42.9
60°/20'	11.33	0.241	47.1	22.00	0.241	91.4	21.67	0.241	90.0	76.1
100°/5'	12.33	0.241	51.2	22.00	0.241	91.4	19.00	0.241	78.9	73.8
100°/20'	11.33	0.241	47.1	22.33	0.241	92.8	20.33	0.241	84.4	74.8
100°/60'	14.00	0.241	58.1	22.67	0.241	94.1	21.33	0.241	88.6	80.3
120°/20'	-----	-----	-----	21.33	0.241	88.6	19.67	0.241	81.7	85.1

Actividad Específica Relativa de *L. pentosus* sobre *E. coli*

Tabla 48. Efecto de la temperatura: Actividad Específica Relativa de <i>L. pentosus</i> sobre <i>E. coli</i>	
Relación T / t (°C/min)	%Actividad Específica Relativa
4°/20'	41.4
10°/20'	42.7
20°/20'	41.6
30°/20'	47.9
37°/20'	50.4
60°/20'	89.4
100°/5'	86.7
100°/20'	87.8
100°/60'	94.3
120°/20'	100.0

11. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Álvarez Barajas Rubén, Barragán López Esteban, Chombo Morales Patricia (2005). ***Reglas de uso. Marca colectiva Queso Cotija Región de Origen.*** Pp.1, 10, 12, 14, 15.
- (2) Anteproyecto de Norma Mexicana PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009, SISTEMA PRODUCTO LECHE-ALIMENTOS-LÁCTEOS-ALIMENTO LÁCTEO REGIONAL-QUESO COTIJA ARTESANAL MADURADO-DENOMINACIÓN, ESPCIFICACIONES Y MÉTODOS DE PRUEBA.
- (3) Audisio, M., Oliver, G. & Apella, M. (2001). *Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of Enterococcus faecium.* **International Journal of Food Microbiology**, 63: 235-241.
- (4) Beresford, T.P., Fitzsimons, N. A., Brennan, N. L. & Cogan, T. M. (2004). *Recent advances in cheese microbiology.* **International Dairy Journal**, 11:259-274
- (5) Bernardeau, M., Vernoux, J.P., Henri-Dubernet, S. & Guéguen M. (2008) *Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus.* **International Journal of Food Microbiology**, 126: 278-285
- (6) Boyce, J. M., Opal, S. M., Potter-Bynoe, G., La Forge, R. G., Zervos, M. J., Furtado, G., Victor, G., & Medeiros, A. A. (1992). *Emergence and nosocomial transmission of ampicillin-resistant enterococci.* **Antimicrobial Agents in Chemotherapy**, 36: 1032–1039.

-
-
- (7) Bravo, A. “*Estudio de las Poblaciones Microbianas de interés biotecnológico aisladas de queso Cotija*”. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México, 2008 Pp. 20.
- (8) Campos, A., Rodríguez, O., Calo- Matta, P., Prado, M. & Barros- Velázquez, J. (2006). *Preliminary characterization of bacteriocins from Lactococcus lactis, Enterococcus faecium and Enterococcus mundtii strains isolated from turbot (Psetta maxima)*. **Food Research International**, 39:356–364.
- (9) Carolissen-Mackay, V., Gottlieb, A. & Hastings, J.W. (1997). *Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria*. **International Journal of Food Microbiology**, 34:1-16
- (10) Cervantes, E. F., Villegas de Gante, A., Cesín, V.A., Espinoza, O. A. (2008). *Los Quesos Mexicanos Genuinos – Patrimonio cultural que debe rescatarse*-. Ed. Mundi-Prensa. Pp.150.
- (11) Cotter, Paul D. (2005) *Bacteriocins: Developing innate immunity for food*. **Nature Publishing Reviews Microbiology**, 3: 777- 786.
- (12) De Kwaadsteniet, M., Todorov, S., Knoetze, H., Dicks, L. (2005). *Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria*. **International Journal of Food Microbiology**, 105: 433-444.
- (13) Delgado, Arciniega E. *Producción de compuestos antibacterianos por Bacterias Ácido Lácticas aisladas de queso Cotija*. Proyecto LABDEA. Facultad de Química, UNAM. México, 2009).
-
-

-
-
- (14) De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994a). *Antimicrobial potential of lactic acid bacteria*. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria* (pp. 91–142). London: Blackie Academic & Professional.
- (15) De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (Eds.) (1994b). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics and Applications* (pp.107-125). London: Blackie Academic & Professional.
- (16) Estrada, H. Cindy. *Análisis Microbiológico de Queso Cotija. Identificación de Microorganismos Patógenos Mediante la Técnica de PCR Punto Final*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México. 2009.
- (17) Franz, M.A.P., Holzapfel, W.H. & Stiles, M. E. (1999). *Enterococci at the crossroads of food safety? Reviews*. **International Journal of Food Microbiology**, 47: 1-24.
- (18) Gänzle, M. G., Hertel, C., Hammes, W. P. (1999) *Resistance of Escherichia coli y Salmonella against nisin and curvacin A*. **International Journal of Food Microbiology**, 48: 37-50.
- (19) Giraffa, G. (2003). *Functionality of enterococci in dairy products*. **International Journal of Food Microbiology**, 88: 215–222.
- (20) Helander, I. M., von Wright, A. & Mattila-Sandholm, T. M. (1997). *Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against gram-negative bacteria*. **Trends in Food Science & Technology**, 8: 146–150.
- (21) Hernández, B. Verónica. *Queso Cotija: Estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM. México 2007.
- (22) Lee, Yuan. C. (2002). *Determination of lysozyme activities in a microplate format*. **Analytical Biochemistry**, 310: 223-224.
-
-

-
-
- (23) Maisnier-Patin, S., Forni, E., & Richard J. (1996). *Purification, partial characterization and mode of action of enterococcin EFS2, an antilisterial bacteriocin produced by a strain of Enterococcus faecalis isolated from a cheese*. **International Journal of Food Microbiology**, 30:255-270. P.p.257
- (24) Moellering Jr., R.C. (1992). *Emergence of Enterococcus as a significant pathogen*. **Clinical Infectious Diseases**, 14: 1173–1176.
- (25) Moreno, M., Leisner, J., Tee, L., Ley, C., Radu, S., Rusul, G., Vancanneyt, M. & De Vuyst, L. (2002). *Microbial analysis of Malaysian tempeh and characterization of two bacteriocins produced by isolates of Enterococcus faecium*. **Journal of Applied Microbiology**, 92: 147-157.
- (26) Nes, I. F., Diep, D. B., Holo, H. (2007). *Bacteriocin diversity in Streptococcus and Enterococcus*. Minireviews. **Journal of Bacteriology**, 189: 1189-1198.
- (27) Noskin, G. A. (1997). *Vancomycin-resistant enterococci: Clinical, microbiological and epidemiologic features*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, 130:14–20.
- (28) Ogier, J.C., Serror, P. (2008). *Safety assessment of dairy microorganisms: The Enterococcus genus*. **International Journal of Food Microbiology**, 126: 291-301.
- (29) Parente, E. & Hill, C. (1992). *A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria*. **Journal of Applied Bacteriology**, 73: 290-298.
- (30) Ponce, A. G., Moreira, M.R., Del Valle, C.E. & Roura, S.I. (2007). *Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables*. **LWT - Food Science and Technology**, 41: 432-441.
- (31) Riley, M. & Wertz, J. (2002) *BACTERIOCINS: Evolution, Ecology, and Application*. **Annual Reviews Microbiology**, 56:117–137.
-
-

-
-
- (32) Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J.L., Rodríguez, J. M., Nuñez, M. & Medina, M. (2005). *Antimicrobial activity of pediocin-producing Lactococcus lactis on Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus and Escherichia coli O157:H7 in cheese. International Dairy Journal*, 15: 51-57.
- (33) Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M. & Medina, M. (2000). *Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw mil. International Dairy Journal*, 10: 7-15.
- (34) Settanni, L., Valmorri, S., Suzzi, G., Corsetti, A. (2008) *The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by Enterococcus mundtii strains. Food Microbiology*. 25: 722-728
- (35) Simonetta, A. C., Moragues de Velasco L. G., Frisón, L. N. (1997). *Antibacterial activity of enterococci strains against Vibrio cholerae. Letters in Applied Microbiology*, 24: 139-143.
- (36) Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., Klaenhammer, T. R. (1991). *Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram-negative bacteria. Applied Environmental Microbiology*, 57: 3613-3615.
- (37) Tagg, J. R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). *Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriologic Reviews*, 40: 722-756.
- (38) Topisirovic, L., Kojic, M., Fira, D., Golic, N., Strahinic, I. & Lozo, J. (2006). *Potential of lactic acid bacteria isolated from specific natural niches in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology* 112: 230-235.
- (39) Vignolo, G., Kairuz, M., Ruiz Holgado, A., & Oliver, G. (1995). *Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by Lactobacillus casei CRL 705. Journal of Applied Bacteriology*, 78: 5–10.
-
-

(40) Wood, Brian J. B., (1992) *The LAB in Health & Diseases*. In: Elsevier Science Publishers LTD (Eds.), *The LAB* Vol. 1. (pp. 212-216). London: Great Britain.

(41) Yaakoubi, K., Benkerroum, N., Wiorowski, F., Sanson, F., Haydersah, J., & Chevallier, I. (2009). *Development of a multiwall antagonistic activity assay for the detection of bacteriocina production by Lactic Acid Bacteria*. **Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology**, 17: 32-45.

(42) Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P., Savu, L., Vatafu, I. & De Vuyst, L. (1999). *Purification and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus IBB 801*. **Journal of Applied Microbiology**, 87: 923–931.

(43) Zúñiga, B. *Descripción e Identificación de la Comunidad Bacteriana Presente en el Queso Cotija por Métodos Moleculares*. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Bioquímicas. UNAM. México. 2009.

Páginas de internet consultadas

(44) Danisco, [en línea] [Consultado en Septiembre 2009]. Disponible en: <http://www.danisco.com/cms/connect/corporate/products%20and%20services/product%20range/antimicrobials/antimicrobial%20ingredients/nisaplin%20and%20novasin%20antimicrobials/>

(45) Estrada, A., Gutiérrez, L., & Montoya, O. (2006). *Evaluación In Vitro del efecto bactericida de cepas nativas de Lactobacillus sp. contra Salmonella sp. y Escherichia coli*. **Revista Mundo Cárnico y Lácteo: Mayo/Junio**. [En línea] Publicado en 2006 [Consultado en Noviembre 2009]. Disponible en:

http://www.alimentariaonline.com/apadmin/img/upload/MLC012_efectobactericidaF.pdf

(46) González, B., Gómez, M., Jiménez, Z. (2003). *Bacteriocinas de probióticos*. **Revista de Salud Pública y Nutrición, Vol.4 No.2. Abril-Junio**. [En línea] Publicado

en 2003 [Consultado en Noviembre 2008]. Disponible en:

<http://www.respyn.uanl.mx/iv/2/ensayos/bacteriocinas.htm>

(47) Monroy M., Castro, T., Fernández, F. & Mayorga, L. (2009). *Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas*. Tesis doctoral. Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco [en línea] [Consultado en Noviembre 2009]. Disponible en:

<http://www.izt.uam.mx/contactos/n73ne/bacterio.pdf>

(48) Pomeón, Thomas. (2007). **EL QUESO COTIJA, MÉXICO. Un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen**. Consultoría realizada para la FAO y el IICA en el marco de estudio conjunto sobre los productos de calidad vinculada al origen. [En línea]

Publicado en 2007 [Consultado Septiembre 2009]. Disponible en:

http://www.fao.org/ag/agns/Projetcs_SQP_Santiago/Documentos/Estudios%20de%20caso/Cotija/Queso_COTIJA_Mexico.pdf

(49) Wordpress.com (2008). **Conservadores Biológicos III**. Tecnología y Alimentos.

[En línea] Publicado en 2008 [Consultado Octubre 2008]. Disponible en:

<http://tecnoyalimentos.wordpress.com/2008/05/13/conservadores-biologicos-iii/>