



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Influencia de compuestos extracelulares de bacterias ácido lácticas
sobre *S. aureus* y *E. coli* en un medio lácteo”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA:

SERGIO CARLOS MATAMOROS ORTEGA

MÉXICO, D.F.

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: RAÚL GENARO AGUILAR CABALLERO
VOCAL: OLGA DEL CARMEN VELÁZQUEZ MADRAZO
SECRETARIO: MARICARMEN QUIRASCO BARUCH
1er. SUPLENTE: MARÍA ELENA CAÑIZO SUÁREZ
2do. SUPLENTE: MARÍA MERCEDES PALAO RINCÓN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 312 Departamento de Alimentos y Biotecnología, Conjunto E. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARICARMEN QUIRASCO BARUCH

SUPERVISOR TÉCNICO:

QA. ISRAEL GARCÍA CANO

SUSTENTANTE:

SERGIO CARLOS MATAMOROS ORTEGA

Este proyecto fue realizado con el financiamiento y apoyo de:
Proyecto PAPIIT IN213109; "El queso Cotija: una fuente de compuestos funcionales y de microorganismos importantes en la inocuidad de alimentos"
Subprograma 127 "Formación Básica en Investigación", período 2009-2010.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
2.1 GENERALIDADES DE LOS QUESOS MADURADOS.....	5
2.2 CULTIVOS INICIADORES	8
2.2.1 <i>Bacterias ácido lácticas</i>	9
2.2.2 <i>Metabolitos involucrados la maduración del queso</i>	12
2.2.3 <i>Metabolitos con actividad antibacteriana</i>	13
2.3 EL QUESO COTIJA	15
2.3.1 <i>Proceso de elaboración</i>	17
3. ANTECEDENTES	20
4. HIPÓTESIS	23
5. OBJETIVOS	23
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	23
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	23
6. METODOLOGÍA	24
6.1 ELABORACIÓN DEL MEDIO LÁCTEO	24
6.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRACELULARES (CE).....	25
6.2.1 <i>Perfil electroforético y actividad lítica</i>	26
6.3 CINÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS INDICADORES	27
6.3.1 <i>Determinación de la cantidad de inóculo inicial</i>	27

6.3.2 Efecto de los CE en el medio BHI	28
6.3.3 Efecto de los CE en el medio lácteo con sal (MLS).....	29
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
7.1 FORMULACIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO LÁCTEO CON SAL (MLS)	30
7.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRACELULARES (CE).....	31
7.2.1 Perfil electroforético y actividad lítica	32
7.3 CINÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS INDICADORES	35
7.3.1 Determinación de la cantidad de inóculo inicial.....	36
7.3.2 Efecto de los CE en el medio BHI	39
7.3.3 Efecto de los CE en el medio lácteo con sal (MLS).....	43
8. CONCLUSIONES	52
9. PERSPECTIVAS	53
10. BIBLIOGRAFÍA.....	54

Agradecimientos y Dedicatorias

A Dios, por ser la fuerza y energía, que ante todo y pese a todo siempre ha estado conmigo al principio y al final de mis triunfos y fracasos.

A mis padres, Adelaida Ortega y Sergio Matamoros, por ser una inspiración y guía en mi vida; por enseñarme a jamás rendirme; por estar conmigo; por ser las personas que más respeto y admiro.

A mi hermana Mayte, por ser la chispa de alegría de la familia y ser motivo de admiración y superación.

A mi tío Arturo, por sus charlas y consejos, por ser como un segundo padre en quien confiar.

A mis abuelos Guillermina y Rafael (q. p. d.) y Teresa (q. p. d.) y Francisco (q. p. d.), por su cariño y compañía, por sus historias que no me aburría de escuchar y sobre todo por forjar los cimientos familiares.

A mis hermanos: Gibrán, Francisco, Víctor, Jonathan, Gerardo, Augusto, Erik Aquino, Erik Morales, Benjamín y Alan, por compartir tantos años de anécdotas, aventuras, pláticas, risas y tantas más enseñanzas en este largo camino. También a la Sra. Rosario por aguantarnos tanto tiempo y brindarnos asilo.

A Liliana V. P., porque la belleza y esplendor del mundo que pensé olvidados me los regalo en la más tierna y honesta de las sonrisas, porque en su mirada encontré inspiración y porque en su persona encontré refugio y amor.

A mis amigos de la facultad: Emilio, Josué, Melina, Juan José, Viridiana, Jimena, Humberto, Dalia, Alfredo, Itzia, Zaine, Denise, Karen, Luis, Suleim, Iliana, Norma y todos con los que compartí tantas horas de laboratorio y diversión en esta carrera.

A la Dra. Maricarmen Quirasco por darme la oportunidad de desempeñar y motivar mi vocación, por su paciencia, enseñanzas y por su dedicación en este proyecto.

A Israel G. C. por apoyarme y guiarme con su experiencia en este proyecto, por integrarme al grupo de trabajo y porque más que un asesor es un gran amigo.

A los integrantes del laboratorio: Dra. Amelia, Dra. Amanda, Pilar, Blanca, Carlos, Estela, Carolina, Aline, Ximena, Eduardo, Mirna, Myrna, Eva, Laura, Verónica, Denise, Brenda, Isabel, Ruth, Mary, Ricardo, Alejandra, José Luis, Ana, Anel y el Sr. Rodrigo por su amistad, compañía, opiniones, apoyo y observaciones que hicieron posible este proyecto.

A la H. Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por permitirme crecer como profesionista, persona e integrante de una de las mejores instituciones educativas a nivel internacional.

A todos aquellos que a lo largo de mi historia han estado ahí, para brindarme una palabra, una enseñanza, una experiencia o un motivo para seguirme mi camino y alcanzar mis metas.

1. RESUMEN

El queso es un derivado lácteo de gran importancia y tradición a nivel mundial que data de varios siglos de antigüedad. Acorde a la región y costumbres de elaboración los quesos poseen características muy diferentes entre si, generando una amplia gama de tipos y derivaciones de este producto.

Dentro de la gran variedad de quesos que se producen en México, uno de los más representativos es el queso Cotija. Este tipo de queso se caracteriza por ser elaborado de manera artesanal, en cuyo proceso de elaboración no interviene algún tratamiento térmico, es salado y pasa por un proceso de maduración.

Debido a que se elabora con leche cruda, en el proceso de maduración intervienen diversos grupos de microorganismos que no han sido adicionados de manera premeditada, entre los cuales se han encontrado bacterias ácido lácticas.

Dentro de las bacterias ácido lácticas aisladas del queso Cotija una cepa de *Lactobacillus paracasei* y una de *Enterococcus faecalis* se utilizaron para la obtención de compuestos extracelulares con actividad antibacteriana. Se analizó su influencia sobre microorganismos indicadores de interés a nivel sanitario que tuvieran una posible presencia en el queso debido a su naturaleza y su proceso de elaboración: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En el presente trabajo se demostró que los compuestos extracelulares semipurificados obtenidos de las cepas de *Lb. paracasei* y *E. faecalis* respectivamente, presentaron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y contra *E. coli* tanto en medio BHI como en un medio lácteo de composición semejante a la cuajada del queso Cotija.

Con la máxima concentración de proteína total que se adicionó de los respectivos compuestos extracelulares semipurificados de cada cepa (6 mg/mL) se observó un efecto bacteriostático sobre *S. aureus*.

En el caso de *E. coli* se obtuvo un efecto bacteriostático al adicionar 12 mg/mL de proteína total de los compuestos extracelulares concentrados de ambas cepas respectivamente.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 GENERALIDADES DE LOS QUESOS MADURADOS

La leche y sus derivados son alimentos especialmente ricos en proteínas y calcio de fácil asimilación, importantes en etapas de crecimiento y desarrollo, y también como recursos para el mantenimiento de la masa ósea y muscular del ser humano. En la actualidad, son el grupo de alimentos de mayor consumo a escala mundial (Astiasarán y Martínez, 1999).

Dentro de los derivados lácteos con mayor antigüedad y aceptación se encuentra el queso. La manufactura de la mayoría de las variedades de queso involucran la combinación de cuatro ingredientes fundamentales: leche, cuajo, microorganismos y sal (Beresford, *et. al.*, 2001).

El queso se define como un producto elaborado con la cuajada de leche, estandarizada y pasteurizada, de vaca o de otras especies animales, obtenido por la coagulación de la caseína con cuajo, gérmenes lácticos, enzimas apropiadas, ácidos orgánicos comestibles y con o sin tratamiento ulterior por calentamiento, drenada, prensada o no, con o sin adición de fermentos de maduración, mohos especiales, sales fundentes e ingredientes comestibles opcionales, dando lugar a las diferentes variedades de quesos pudiendo ser: fresco, madurado o procesado (NOM-121-SSA1-1994).

La textura, sabor y el aroma del queso están estrechamente ligados a la composición (contenido de agua, en proteínas, en materia grasa y en minerales), el pH de la cuajada, las condiciones de maduración, las características originales de la leche, etc. Estas propiedades dependen a su vez de la transformación de leche en queso, la cual comprende en general cuatro etapas: (Eck, 1990)

- a) La coagulación, que se traduce como el resultado de las modificaciones fisicoquímicas de micelas de caseína bajo la acción de enzimas proteolíticas y/o de ácido láctico que determinan la formación una red proteínica denominada coágulo.
- b) El desuerado, es la separación del suero después de la ruptura mecánica del coágulo, por moldeado y en algunos casos con ayuda de presión, con lo que se obtiene la cuajada.
- c) El salado se refiere a la incorporación de la sal en la superficie, en la masa o por inmersión en salmuera.
- d) La maduración es el conjunto de transformaciones bioquímicas de los componentes de la cuajada por acción de microorganismos o enzimas, la mayor parte de ellas de origen bacteriano.

Los cambios que ocurren en la etapa de maduración son determinados por el proceso de manufactura, por la composición (especialmente humedad, concentración de cloruro de sodio y pH), por el nivel residual de actividad coagulante, por el tipo de cultivos iniciadores y en muchos casos por la microbiota ambiental que no se adiciona intencionalmente o la presente en la materia prima (Tabla 1) (Fox, *et. al.*, 2000).

Tabla 1. Aspectos que determinan los cambios en la maduración

Aspectos importantes en la maduración del queso
Cantidad de cuajo y actividad coagulante residual
Tamaño y forma de la pieza
Tamaño de corte de la partícula
Humedad y actividad acuosa
Temperatura de cocción
Salado
Contenido de grasa
Valor de pH (en el suero y en el queso)
Concentración de ácidos orgánicos (En la leche y generados en la fermentación)
Tipo de cultivo iniciador
Microbiota (secundaria y la presente en la superficie)

(Van den Berg y Exterkate, 1993)

Las transformaciones bioquímicas principales incluyen a la glucólisis, lipólisis y proteólisis, las cuales se dan paralelamente; y a su vez sus productos son involucrados en cambios catabólicos secundarios, como la desaminación, descarboxilación y desulfuración de aminoácidos, betaoxidación de ácidos grasos, y algunas reacciones de síntesis como por ejemplo la esterificación, entre otras (Fox, *et. al.*, 2000).

Dentro de las reacciones glucolíticas se encuentra la conversión de lactosa en lactato que es mediada principalmente por las enzimas de los cultivos iniciadores, comienza durante la coagulación y el desuerado, continúa en las etapas tempranas de la maduración hasta la desaparición casi completa de la lactosa. El ácido láctico y lactatos procedentes de la degradación de la lactosa pueden ser metabolizados por la microbiota secundaria como levaduras, mohos y otras bacterias, que oxidan al ácido láctico a CO₂ y H₂O, a través del ciclo de Krebs, incluso puede ser transformado en acetato, propionato, ácido butírico, ácido acético, etc (Eck, 1990; Fox, *et. al.*, 2000).

El grado de lipólisis es variable entre los diferentes tipos de quesos, dado que la materia grasa se presenta según las condiciones de obtención de la cuajada, afectando el nivel inicial de ácidos grasos libres en el queso y, como consecuencia, la velocidad de lipólisis durante la maduración. Los principales agentes responsables de la lipólisis son las lipasas, que pueden ser nativas de la leche o provenientes de los microorganismos presentes como los mohos, que son los más lipolíticos, o las bacterias ácido lácticas, que pese a tener poca actividad lipolítica son responsables cuando son la población dominante en el queso, reforzando la acción de la lipasa nativa de la leche en los quesos elaborados con leche cruda (Eck, 1990).

La proteólisis es la transformación bioquímica más importante que no sólo interviene en el sabor, sino también en el aspecto y la textura, además de ser de los más complejos e investigados (Fox, *et. al.*, 2000). Las enzimas del cuajo, las nativas de la leche (plasmina), de los cultivos iniciadores (bacterias ácido lácticas), de los cultivos no iniciadores y las enzimas de la microbiota secundaria son las responsables de la

proteólisis en el queso denotando que sus acciones son complementarias (Van den Berg y Exterkate, 1993).

Existen diferencias notables según el tipo de queso, por ejemplo en los quesos de pasta prensada la degradación de proteínas es poco intensa, la proteólisis global es netamente superior en los quesos de pasta blanda con corteza enmohecida, o en los quesos de pasta cocida (Eck, 1990). La proteólisis contribuye directamente al sabor del queso al liberar péptidos y aminoácidos, los cuales son sustratos de reacciones tales como la transaminación, descarboxilación, deshidrogenación y reducción (Marilley y Casey, 2003).

Las transformaciones bioquímicas confieren nuevas características a la composición, estructura, aspecto, consistencia y color del queso y simultáneamente el sabor y el aroma se acentúan (Eck, 1990). La gran variabilidad y posibles combinaciones tanto de los factores fisicoquímicos como de los factores enzimáticos que presenta cada tipo de queso les confiere atributos exclusivos y muy diferenciados entre sí.

Los agentes que generan estas transformaciones bioquímicas pueden ser básicamente de tres orígenes: enzimas coagulantes (derivadas del cuajo residual), enzimas nativas de la leche y enzimas de los microorganismos. Éstos últimos son los agentes de mayor importancia dado que la diversidad de los mismos contribuye a la complejidad del proceso porque pueden proceder de la leche, de la sal utilizada, de la atmósfera local, de la microbiota secundaria y de los cultivos iniciadores (Eck, 1990).

2.2 CULTIVOS INICIADORES

En la amplia variedad de quesos que se producen industrial o artesanalmente a nivel mundial, la microbiota asociada contribuye a la biopreservación y al desarrollo de las propiedades organolépticas de los quesos (Irlinger y Mounier, 2009). Dentro de la

microbiota asociada se contempla a los cultivos iniciadores, los cuales se pueden definir como una mezcla de uno o más microorganismos que producen suficiente ácido para reducir el pH de la leche a menos de 5.3 en 6 h. Los cultivos iniciadores son adicionados deliberadamente al inicio de la elaboración del queso o pueden ser nativos de la leche, como en el caso de los quesos artesanales que se elaboran con leche bronca (Beresford, *et. al.*, 2001).

Los cultivos iniciadores son comúnmente divididos en cultivos mesófilos (con una temperatura óptima de crecimiento de aproximadamente 30 °C) y termófilos (con una temperatura óptima de crecimiento de 42 °C), cada grupo puede ser subdividido en cultivos definidos o mezcla de cultivos.

Los cultivos definidos son cultivos puros con características fisiológicas conocidas e identificables. Por otra parte, en la mezcla de cultivos se desconoce el número de cepas presentes y puede contener diferentes géneros de bacterias incluyendo ácido lácticas (Fox, *et. al.*, 2000).

2.2.1 Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias que comparten características morfológicas, metabólicas y fisiológicas. La descripción general de estas bacterias incluye que son gram-positivas, no esporuladas, cocos o bacilos habitualmente anaerobios pero aerotolerantes, ácido-tolerantes, las cuales generan ácido láctico como producto mayoritario al final de la fermentación de carbohidratos. Tienen necesidades complejas de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y pirimídicas. A nivel de laboratorio se deben emplear medios selectivos que posean estas características para su aislamiento (por ejemplo, el caldo o agar MRS) (Cabeza-Herrera, 2006).

Son un grupo destacado de bacterias en la tecnología de alimentos porque constituyen la microbiota dominante en la mayoría de las fermentaciones de alimentos a nivel mundial (Salminen, *et. al.*, 2004). Se encuentran en cantidades importantes en el ambiente, además de presentar un metabolismo variado, de acuerdo al cual se pueden clasificar en: (De Vuyst y Vandamme, 1994)

- a) Homofermentativas. En las que el metabolismo de fermentación es a través de la vía de la glucólisis de la cual se obtiene como producto principal ácido láctico.
- b) Heterofermentativas. Las bacterias de este grupo llevan a cabo la fermentación a través de la vía de las pentosas, generando además de ácido láctico pequeñas cantidades de etanol, ácido acético y CO₂.

Los géneros más representativos de las BAL son: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weisella*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Figura 1) (Salminen *et. al.*, 2004).

Los géneros *Lactobacillus* y *Enterococcus* son significativos porque a pesar de ser cultivos no iniciadores se encuentran presentes de forma regular en la mayoría de los quesos elaborados a partir de leche bronca (Beresford, *et. al.*, 2001; Christiansen, *et. al.*, 2006; Rodríguez, *et. al.*, 2000).

El género *Lactobacillus* se divide en tres subgrupos: homofermentativos obligados, heterofermentativos obligados y heterofermentativos facultativos, dependiendo si cuentan con aldolasa o fosfoacetolasa. Son bacilos gram-positivos presentes en ambientes con alta disponibilidad de carbohidratos, son generalmente los más ácido-tolerantes de las BAL, acorde al subgrupo que pertenezcan son capaces de crecer en ambientes con una concentración de 6.5 % (p/v) de NaCl y desarrollarse a una temperatura entre 15 y 45 °C (Bernardeau, *et. al.*, 2008; Fox, *et. al.*, 2000; Salminen, *et. al.*, 2004).

Mientras que el género *Enterococcus* forma parte de la microbiota intestinal de humanos y animales, desempeña un papel muy importante en el equilibrio de dicho microambiente. Son cocos gram-positivos con arreglo de cadenas o pares, son termotolerantes y halotolerantes, ya que crecen a una temperatura de 45 °C y en presencia de 6.5 % (p/v) de NaCl; además pueden desarrollarse en ambientes con pH igual 9.6, por otra parte el rango óptimo de temperatura para su desarrollo es de 10 a 45 °C (Fox, *et. al.*, 2000; De Kwaadsteniet, *et. al.*, 2005; Salminen, *et. al.*, 2004).

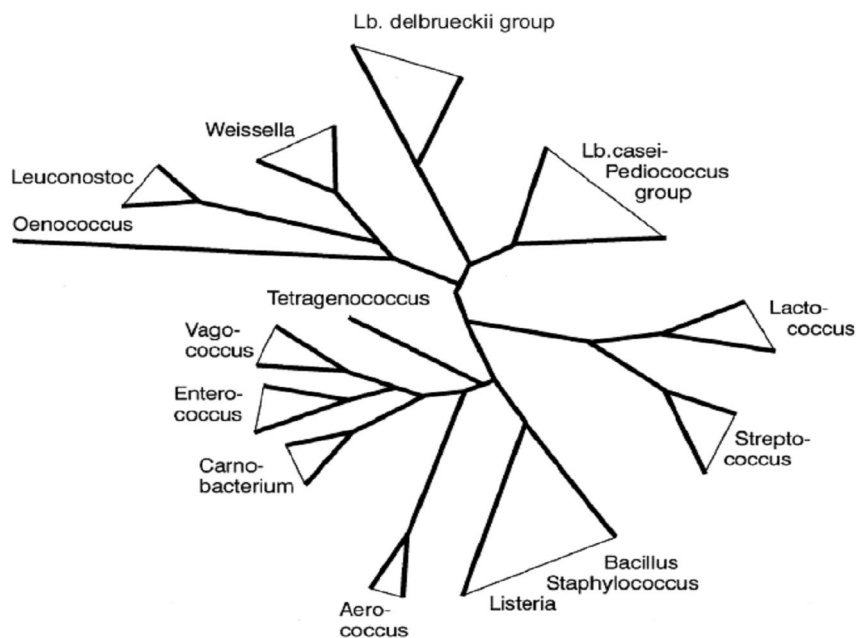


Figura 1. Esquema filogenético de bacterias ácido lácticas, incluyendo algunos aerobios y anaerobios facultativos gram-positivos (Salminen, *et. al.*, 2004).

Las bacterias ácido lácticas son ampliamente utilizadas como cultivos iniciadores y su función, al igual que la de los cultivos no iniciadores, es producir ácido durante el proceso de la fermentación principalmente; sin embargo también contribuyen a la maduración del queso porque sus enzimas están involucradas en la proteólisis y en la conversión de aminoácidos en compuestos de aroma y sabor (Fox y Wallace, 1997).

2.2.2 Metabolitos involucrados la maduración del queso

Las bacterias ácido lácticas proveen de una fuente de enzimas tales como proteinasas, peptidasas, lipasas, enzimas del catabolismo de aminoácidos que pueden ser extracelulares y/o intracelulares que intervienen a lo largo del proceso de maduración (Tabla 2) (Garde, *et. al.*, 2005).

Tabla 2. Clasificación de las enzimas de los microorganismos que intervienen en la maduración del queso

Tipo de enzima	Función
Proteolíticas	Se dividen a su vez en: endopeptidasas (proteasas), que hidrolizan a las proteínas liberando péptidos; y las exopeptidasas (aminopeptidasas, carboxipeptidasas, dipeptidasas) que rompen los péptidos originando aminoácidos
Lipasas	Son enzimas capaces de hidrolizar los triglicéridos dando lugar a ácidos grasos y a glicéridos parciales
Activas sobre aminoácidos	Modifican o descomponen a los aminoácidos liberados por las exopeptidasas. Por ejemplo: descarboxilasas, desaminasas, transaminasas, desmetilolasas
Activas sobre ácidos grasos	Son el origen de la formación de ácidos beta-acetónicos, de metilcetonas y de alcoholes secundarios. Por ejemplo: deshidrogenasas, descarboxilasas

(Eck, 1990; Garde, *et. al.*, 2005)

Todas las enzimas, de forma independiente y a su vez en su conjunto, intervienen en las transformaciones bioquímicas antes descritas de la maduración. En las cuales se generan compuestos distintos en función de las condiciones del ambiente, la microbiota y la materia prima de la cual se parte.

Dentro de los compuestos característicos se encuentran los ácidos orgánicos principalmente productos de la fermentación de la lactosa, ácidos grasos libres de naturaleza variada, alcoholes secundarios, aldehídos y cetonas generados en la lipólisis, péptidos, aminoácidos y compuestos nitrogenados. Sin embargo no sólo se

producen compuestos que afectan las propiedades organolépticas y fisicoquímicas sino también compuestos químicos diversos que tienen actividad contra otros microorganismos presentes en el proceso.

2.2.3 Metabolitos con actividad antibacteriana

En la fermentación que efectúan las BAL se transforma una cantidad importante de carbohidratos en ácidos orgánicos (ácido láctico, ácido acético y ácidos propiónicos). Además se producen metabolitos secundarios como dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, etc (Tabla 3). Por lo que esta habilidad de las BAL para producir sustancias antimicrobianas ha sido utilizada a lo largo de la historia para preservar alimentos (Alvarado, *et. al.*, 2006; Salminen, *et. al.*, 2004).

Por ejemplo, se ha reportado la inhibición de microorganismos patógenos tales como *Escherichia coli* O157:H7, por ácidos orgánicos (particularmente ácido láctico) que fueron producidos por cepas de *Lactobacillus* (Vallejo, *et. al.*, 2009).

Otros compuestos de gran interés son las bacteriocinas, producidas por las bacterias ácido lácticas. Las bacteriocinas son péptidos pequeños y termoestables que tienen actividad contra otras bacterias generalmente relacionadas filogenéticamente (Cotter, *et. al.*, 2005).

De las bacteriocinas se tienen múltiples reportes acerca de su efecto antibacteriano. En el 2000 Rodríguez, *et. al.*, lograron identificar y caracterizar cepas de *Lactobacillus* y *Enterococcus* productoras de bacteriocinas que mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*.

De forma semejante, en el 2007 Todorov y Dicks, obtuvieron una bacteriocina de una cepa de *Lactobacillus pentosus* aislada del boza (bebida preparada por una

combinación de cereales). Ésta inhibió el crecimiento de *Lb. casei* y *curvatus*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. faecalis* y *Klebsiella pneumoniae*.

Tabla 3. Sustancias producidas por BAL con efecto antibacteriano

Sustancia antibacteriana	Características
Ácidos orgánicos	Algunos ácidos débiles tienen actividad antibacteriana al disminuir el valor de pH del medio. El ácido acético es el más fuerte al inhibir ampliamente a levaduras, hongos y bacterias; mientras que el propiónico tiene actividad frente a hongos y levaduras
Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Es un agente oxidante que inhibe o destruye a las bacterias por medio de la oxidación de lípidos de la membrana y de la inactivación de las enzimas a través de la oxidación de los grupos sulfhidrilo de las proteínas
Dióxido de carbono (CO ₂)	Tiene un efecto antibacteriano dual, porque su formación crea un ambiente anaerobio y provoca inhibición enzimática en la bicapa lipídica generando disfunción en la permeabilidad de membrana
Diacetilo	Reacciona con el enlace arginina de las proteínas afectando el uso del aminoácido. Su efectividad aumenta en valores de pH menores de 7, es más activo contra bacterias gram-negativas
Reuterina	Inhibe el sitio de unión de la subunidad de ribonucleótido reductasa interfiriendo en la síntesis del ADN
Bacteriocinas	Son una amplia familia heterogénea de péptidos o proteínas que poseen actividad antagonista contra especies filogenéticamente relacionadas

(Salminen, *et. al.*, 2004; Cotter, *et. al.*, 2005)

Muchos de los metabolitos con actividad antibacteriana son producidos paralelamente a los derivados de las principales reacciones bioquímicas durante la maduración del queso. Por ejemplo, una cepa de BAL (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis*) que interviene en la maduración del queso modificando propiedades organolépticas también produce una bacteriocina (Garde, *et. al.*, 2005).

Lo anterior es muy importante porque indica que la microbiota asociada, en este caso las bacterias ácido lácticas, contribuyen tanto a la producción de compuestos que brindan propiedades organolépticas características a los quesos, como también a la biopreservación de los mismos (Irlinger y Mounier, 2009).

Este efecto es benéfico y tiene un mejor campo de aplicación principalmente en los quesos que conllevan un proceso de maduración. En México son pocos los quesos originarios madurados, debido a la falta de control con la que se elaboran y las condiciones ambientales.

Por estas razones los quesos se pudren antes de un buen madurado uniforme, no obstante se tienen algunos quesos de maduración rápida, como el Doble crema de Chiapas, el Sopero de Tabasco y el Sierra del centro del país y de maduración tardía como el Balancam, el Añejo, el de Bola de Chiapas, el Huasteco y el Cotija de Michoacán y Jalisco (Gutiérrez-Ortega, 2008).

2.3 EL QUESO COTIJA

El queso Cotija es un producto lácteo fermentado, salado y madurado que se elabora en la región que se ubica en las inmediaciones serranas entre los estados de Jalisco y Michoacán, en jurisdicción de los municipios de Sta. María del Oro y Jilotlán, Jalisco, sur de Tocumbo y Cotija, Michoacán, principalmente. Es un queso elaborado de manera artesanal elaborado con leche cruda de vaca, salado, madurado por un tiempo mínimo de 3 meses, de formato cilíndrico, de pasta prensada, de textura dura y firme que presenta corteza propia de color marfil a ocre (PROY-NMX-F-735-COFOCALEC-2009). La producción de queso Cotija, en nuestro país se encuentra regulada según las “Reglas de uso de la Marca Colectiva: queso Cotija región de origen” (Álvarez, *et. al.*, 2005).

La zona de producción reconocida por las reglas de uso de la marca colectiva, abarca una superficie de aproximadamente 2 400 km², de los 19° 15' a los 19° 40' de latitud norte y de los 102° 30' a los 103° 05' de longitud oeste. Es una zona continua, ubicada en la sierra Jalmich, entre los estados de Jalisco y de Michoacán, incluyendo principalmente los municipios de Santa María del Oro (Jalisco) y la parte sur de los municipios de Cotija y de Tocumbo (Michoacán). Además se extiende a territorio de los municipios siguientes: norte de Jilotlan de los Dolores, oriente de Tamazula, sur de Valle de Juárez y de Quitupan (Jalisco); suroeste de los Reyes, Periban y Tancitaro, y norte de Buena Vista Tomatlan (Michoacán). En realidad, los municipios que se involucraron y que cuentan con productores participando en el proceso de calificación del queso Cotija son seis: Santa María del Oro, Jilotlan de los Dolores y Quitupan (Jalisco); Cotija, Tocumbo y Buena Vista Tomatlan (Michoacán).

Esta zona de producción se delimitó con base en factores agronómicos, humanos, geográficos, físicos, incluyendo la topografía y el clima, traducidos en ciertos parámetros de temperatura y precipitación pluvial anual:

- ✓ La región es una ladera templada, de transición climática, muy plegada y con escalonamiento altitudinal, que va desde los pies de monte que se elevan desde el valle de Tierra Caliente y que llega un poco antes de las cumbres frías del eje neovolcánico (Figura 2).
- ✓ La altitud esta comprendida entre los 700 y 1700 metros sobre el nivel del mar aproximadamente.
- ✓ Las precipitaciones medias anuales están comprendidas entre 900 mm al sur y 1200 mm en los otros puntos cardinales.
- ✓ La región se caracteriza por una cubierta vegetal tipo selva baja caducifolia con vegetación secundaria irregular. Queda excluida la zona de bosque mixto (encino-pino), ubicada en las partes más altas de la región.
- ✓ Predomina el suelo areno-arcilloso y pedregoso.



Figura 2. Zona de la región de origen del queso Cotija definida según las Reglas de Uso (Álvarez *et. al.*, 2005)

Es en este medio específico que pastorea el ganado vacuno productor de la leche con la cual se elabora el queso Cotija. Las características de clima, altura y suelo originan una vegetación típica del lugar, que se refleja en la composición y las características de la leche producida. Por otra parte, la humedad relativa de la zona, vinculada a la temperatura, las lluvias y la altura, se relaciona con las características del queso elaborado y añejado en la zona (Pomeón, 2007).

Este queso tiene una tradición de producción de más de 400 años, y se busca obtener la denominación de origen; este queso ha ganado reconocimiento a nivel mundial debido a sus características organolépticas tan particulares proporcionadas por la zona geográfica donde es elaborado así como por el método artesanal de su obtención.

2.3.1 Proceso de elaboración

El proceso de elaboración del auténtico queso Cotija de acuerdo a las Reglas de Uso consta de las siguientes etapas: (Hernández-Alcántara, 2010; Zúñiga, 2009; Álvarez, *et. al.*, 2005)

- 1) Obtención de la leche. El ganado que se utiliza es criollo o híbrido alimentado por libre pastoreo en la zona delimitada de la región de origen y la ordeña se realiza manualmente durante la época de lluvia (junio a octubre).
- 2) Manejo y traslado. La leche es recolectada en cubetas y vertida en contenedores, tiene un reposo que permite el descenso de la temperatura de 37 °C a aproximadamente 30 °C. Se adiciona el cuajo mezclando rápidamente y dejando reposar hasta que la cuajada adquiera la consistencia para proceder al corte.
- 3) Corte de la cuajada y separación del suero. La consistencia de la cuajada se prueba cruzándola, ésta debe ser firme. Aproximadamente 2 h después, se corta hasta obtener grumos equivalentes en tamaño a un grano de maíz. La cuajada cortada se desuera por drenado, seguido del manteado el cual consiste en pasar la cuajada por un cedazo limpio, donde se exprime.
- 4) El salado. El salado se realiza amasando la cuajada manualmente incorporando la sal, se adiciona la cantidad proporcional a la leche que se empleo ese día.
- 5) Moldeado y prensado. Se coloca la cuajada dentro de un molde en forma de faja o aro cubierto en su interior con fibra de maguey (ixtle) que envuelven a la pasta. La pasta es prensada por un período de 18 a 24 h. Transcurrido el período la pasta se desfaja y se vuelve a fajar ajustando al diámetro obtenido después del prensado diariamente durante 15 días, esta operación en particular se denomina oreado.
- 6) La maduración. El queso se limpia y se voltea diariamente alternando la cara expuesta al aire durante los primeros tres meses, esto se lleva a cabo en un ambiente con humedad relativa de 80 % y temperatura de 20 a 25 °C. En función del período de maduración el queso Cotija se puede clasificar en añejo cuando tenga entre tres y seis meses de vida y rendido cuando tenga más de seis meses de vida.

Su período de elaboración se restringe a los meses con precipitaciones constantes debido a que la vegetación con la que se alimenta el ganado es más abundante durante

esa época, mejorando la producción de leche. Su proceso de maduración se lleva durante el resto del año, con lo que se logra un producto único que se comercializa tradicionalmente hacia el fin de año (Hernández-Briones, *et. al.*, 2009).

El queso Cotija se caracteriza por ser un queso con un alto contenido de sal, baja actividad acuosa, madurado mínimo tres meses y ser producido de manera artesanal sin la aplicación de algún tratamiento térmico; por lo tanto, la diversidad y variabilidad microbiológica del mismo es amplia.

3. ANTECEDENTES

El queso Cotija es un queso con mucha historia y varios siglos de producción que ha sobrevivido gracias a la transmisión generacional de costumbres y tradiciones en la Sierra de Jalmich. Prueba de esto es que su proceso de elaboración sigue siendo artesanal confiriéndole propiedades únicas a nivel mundial. Lo que generó el interés por parte de un grupo de productores del queso Cotija de garantizar su autenticidad.

En un esfuerzo conjunto en el año 2005 los productores de la región de Jalmich crearon una asociación llamada Asociación Regional de Productores de Queso Cotija. Dicha asociación logró obtener la Marca Colectiva, un signo distintivo que sirve para diferenciar en el mercado un producto genuino de una imitación y permite garantizar la calidad a los consumidores (Hernández-Briones, *et. al.*, 2009; Álvarez, *et. al.*, 2005).

La Marca o signo se coloca en el producto para indicar especialmente que ha sido elaborado por un grupo específico de personas en una región determinada, lo cual incluye el uso de su nombre oficial: Queso Cotija Región de Origen ^{MC}.

La calidad y excelencia de este queso son tan genuinas que en el año 2006 el queso Cotija Región de Origen fue reconocido entre 500 participantes como el mejor Queso Extranjero del Año en el campeonato mundial sobre ese derivado de la leche en Cremona, Italia (Sánchez, 2006).

Es por ello que la Asociación Regional de Productores de Queso Cotija busca obtener la Denominación de Origen, para diferenciar legalmente a nivel internacional el producto auténtico de las imitaciones y de quesos “tipo Cotija”, además de ayudar a los productores a conservar su tradición en la elaboración y extender su distribución a mercados nacionales e internacionales (Hernández-Briones, *et. al.*, 2009).

El esfuerzo realizado se lleva a cabo en diferentes campos de investigación, dentro de los que destacan los estudios microbiológicos del queso Cotija, al ser un queso elaborado de forma artesanal donde no interviene ningún tratamiento térmico (Álvarez, *et. al.*, 2005). Además, se sabe que en su maduración intervienen diferentes grupos de microorganismos no adicionados de forma premeditada, predominantemente bacterias.

En el 2007, Hernández-Mejía logró aislar e identificar bacterias proteolíticas del queso Cotija de los géneros *Bacillus*, *Staphylococcus* y *Enterococcus*, explicando su presencia debido a las condiciones ambientales donde se elabora el queso, así como a las propiedades fisicoquímicas del mismo.

Posteriormente, Bravo-Mendoza (2008) demostró que la población de coliformes disminuye conforme transcurre la maduración, al observar una disminución de más del 95 % de la población inicial a un tiempo aproximado de 60 días de la elaboración del queso Cotija, probablemente por la producción de ácidos orgánicos, la disminución del pH, la disminución de la actividad acuosa y/o la posible producción de metabolitos de las bacterias ácido lácticas.

Las BAL son de particular interés, al ser generalmente aceptado que contribuyen en el desarrollo de aspectos organolépticos distintivos del queso durante la maduración, al incrementar la concentración de aminoácidos libres que influyen en el sabor y el aroma (Hussain, *et. al.*, 2009). Asimismo, se tienen reportes acerca de la diversidad de compuestos antibacterianos que producen en leche bronca (Rodríguez, *et. al.*, 2000).

También las BAL y sus metabolitos son utilizadas, junto con tratamientos térmicos, en el control de microorganismos patógenos como *S. aureus* en productos lácteos (Muñoz, *et. al.*, 2007). Y por otra parte se manipulan de forma recombinante para la producción de pediocinas aplicadas directamente en el queso para el control de *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *S. aureus* (Rodríguez, *et. al.*, 2005).

De las cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) que intervienen en la maduración del queso Cotija se han logrado aislar y caracterizar algunas, entre las cuales se pueden mencionar: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus pentosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Lactobacillus brevis* (Bravo-Mendoza, 2008).

De los microorganismos aislados se ha logrado establecer que los compuestos extracelulares producidos en la fase estacionaria temprana de crecimiento de tres cepas del género *Lactobacillus* y una del género *Enterococcus* ejercen un efecto antibacteriano, observado por la técnica de difusión en agar, sobre los microorganismos *S. aureus* y *E. coli* (Hernández-Alcántara, 2010).

Específicamente, los compuestos extracelulares obtenidos a las 10 h de crecimiento de las cepas de *E. faecalis* y *Lb. paracasei* mostraron mayor actividad antibacteriana *in vitro*. El extracto extracelular de la cepa de *Lb. paracasei* tuvo un mayor efecto inhibitorio contra *S. aureus*; mientras que el extracto correspondiente de la cepa de *E. faecalis* presentó mayor efectividad contra *E. coli*. Ambos efectos determinados mediante un análisis cuantitativo de microplaca y de cinéticas de crecimiento para cada microorganismo (Delgado-Arciniega, en revisión).

Lo anterior es de gran importancia, porque permite establecer un panorama general en el cual las bacterias ácido lácticas podrían ser participes en la disminución de coliformes en el proceso de elaboración del queso Cotija (Bravo-Mendoza, 2008; Hernández-Alcántara, 2010).

Sin embargo, las propiedades fisicoquímicas del queso Cotija son muy diferentes al medio donde se cultivaron los microorganismos indicadores (BHI), por tanto resulta de interés conocer si los compuestos extracelulares de las BAL aisladas del queso presentan un comportamiento similar en un medio de cultivo complejo, similar a la cuajada del queso.

4. HIPÓTESIS

Al adicionar un concentrado de compuestos extracelulares producidos por *E. faecalis* y *Lb. paracasei*, aislados del queso Cotija, a cultivos de *S. aureus* y *E. coli* en un medio de composición semejante a la cuajada de ese producto lácteo, se obtendrá un efecto bacteriostático similar al observado en cultivos de estos patógenos en medio BHI.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de los compuestos extracelulares producidos por las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus paracasei* aisladas del queso Cotija, sobre los microorganismos indicadores *Staphylococcus aureus* ATCC6538 y *Escherichia coli* DH5 α , en un medio lácteo.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

Obtener los compuestos extracelulares de las cepas de *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus paracasei*, aisladas del queso Cotija, cultivadas en medio MRS. Determinar la presencia de proteínas con actividad lítica en los mismos.

Diseñar un medio lácteo de composición similar a la cuajada que se utiliza para la elaboración del queso Cotija.

Analizar el efecto de los extractos extracelulares con actividad antibacteriana, sobre el crecimiento de los microorganismos indicadores *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el medio lácteo diseñado.

6. METODOLOGÍA

La estrategia experimental completa en función de los objetivos particulares se muestra en la Figura 3

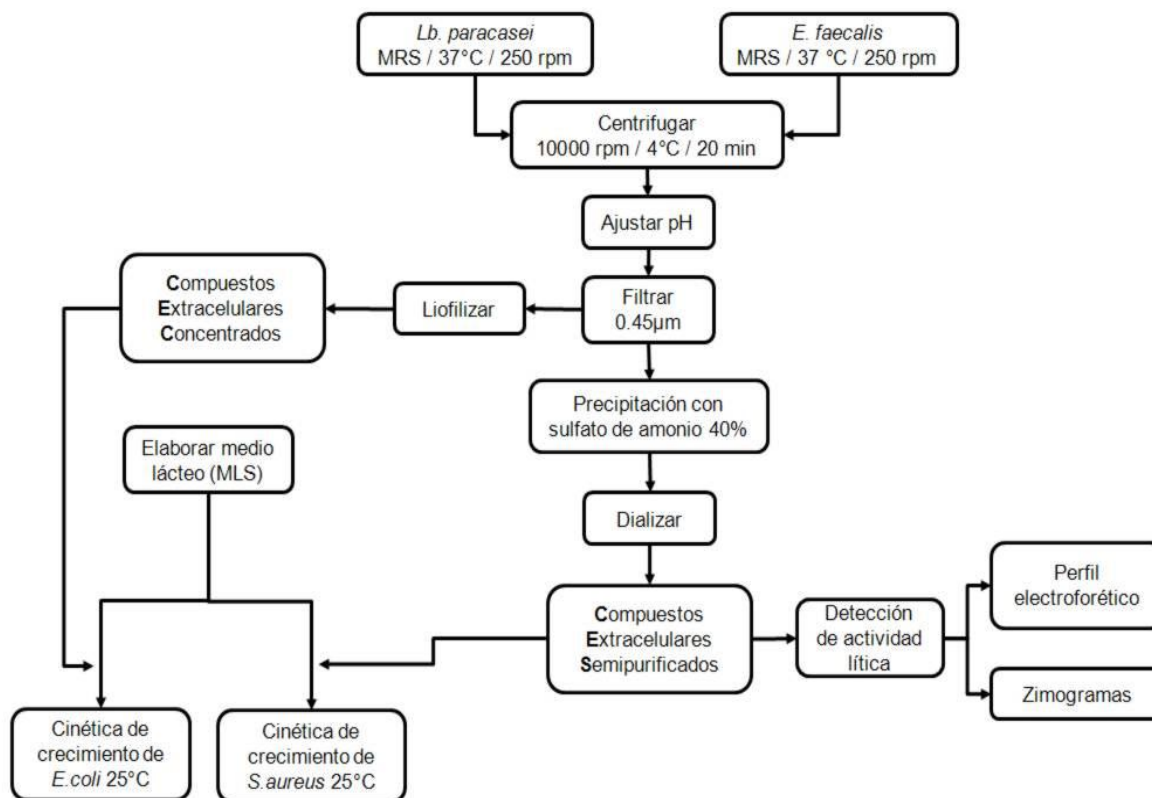


Figura 3. Diagrama de trabajo para la obtención de compuestos extracelulares de las cepas *Lb. paracasei* y *E. faecalis* y su aplicación en un medio lácteo con sal.

6.1 ELABORACIÓN DEL MEDIO LÁCTEO

Para la elaboración del medio lácteo con características similares a la cuajada que se utiliza en la manufactura del queso Cotija, se usó leche entera UHT marca Alpura Selecta® y sal de grano comercial marca Elefante®.

Se colocaron 2.48 g de sal de grano en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, el cual se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 min (Yamato Sterilizer Mod. SM

300). Posteriormente, en condiciones asépticas se le adicionaron 50 mL de leche entera UHT, a este sistema se le denominó medio lácteo con sal (MLS).

El porcentaje final de sal del MLS fue de 5 % (p/v), con la cantidad de sal de grano que se adicionó a los 50 mL de leche entera UHT y considerando la sal presente en la misma. Al MLS se le midió el pH (Beckman, Mod. 34), el valor de a_w (Rotronic Instrument AwQuick) y la acidez titulable reportada como porcentaje de ácido láctico. Lo anterior con la finalidad de comparar tales parámetros fisicoquímicos con la materia prima utilizada en la elaboración del queso Cotija.

6.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRACELULARES (CE)

Las cepas de bacterias ácido lácticas: *Lb. paracasei* y *E. faecalis* conservadas en glicerol al 15 % (v/v) a -20°C , se reactivaron en un matraz Erlenmeyer de 50 mL con 20 mL de medio MRS (de Man, Rogosa, Sharpe OXOID) con incubación a 37°C y 250 rpm durante 24 h (New Brunswick, Mod. Innova 4000).

De las cepas reactivadas previamente, se tomaron 2 mL de forma independiente y se adicionaron a un matraz Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio MRS. Se incubaron a 37°C y 250 rpm durante 24 h.

La fermentación finalizó a las 14 h de cosecha para ambas cepas y se centrifugó a 10000 rpm, durante 20 min a 4°C (Beckman, Mod. J2-MC). Después al sobrenadante se le midió el pH y se ajustó a un valor de 7 mediante la adición de NaOH al 50 % (v/v), una vez neutralizado se filtró con una membrana de $0.45\ \mu\text{m}$ (Millipore HVLP).

Posteriormente, para los compuestos extracelulares (CE) semipurificados se sometió a una precipitación con sulfato de amonio al 40 % (p/v) a 4°C durante 2 h con agitación constante. A continuación se centrifugó a 17000 rpm, durante 30 min a 4°C . El sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 1.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 100 mM, con pH 7. Se dializó en una membrana con

tamaño de corte de 1 kDa (Spectra Por 7) contra 4 L de agua destilada con agitación constante durante 16 h a 4 °C.

En el caso de los compuestos extracelulares (CE) concentrados después de la filtración con la membrana de 0.45 µm, se liofilizaron (Labconco, Freezer Dry System) y se resuspendieron de forma independiente en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 100 mM a pH 7.

6.2.1 Perfil electroforético y actividad lítica

A los compuestos extracelulares, tanto a los semipurificados como a los concentrados, se les determinó concentración de proteína total por el método de Bradford (Biomate 3, Thermo Scientific) (Bradford, 1976). La curva patrón de referencia que se utilizó para este método se realizó con un estándar de albúmina sérica bovina (1.42 mg/mL).

El perfil electroforético se determinó mediante geles SDS-PAGE, estos son ampliamente usados para resolver y caracterizar componentes proteínicos (Lacks and Springhorn, 1980). Para obtener una mejor resolución de proteínas de bajo peso molecular se optó por aplicar la variante de geles SDS-Tris-Tricine-PAGE al 12 % como describe Bazán-Gómez (2007). Ambos teñidos con azul de Coomasie (0.1 % azul de Coomasie R-250, 45 % metanol, 10 % ácido acético glacial y 45 % de agua).

Para detectar la actividad lítica se emplearon zimogramas (Leclerc y Asselin, 1989) utilizando como sustrato 0.2 % de células de los microorganismos indicadores *S. aureus*, *E. coli* y *Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 (Sigma-Aldrich) de forma independiente. La tinción de éstos se realizó con azul de metileno (0.01 % de KOH y 0.1 % de azul de metileno).

La alta concentración de carbohidratos presente en el extracto extracelular concentrado interfiere en las técnicas electroforéticas y de zimografía. Debido a esto el perfil de pesos moleculares y la actividad lítica se realizó únicamente con los extractos semipurificados de las cepas *Lb. paracasei* y *E. faecalis*.

6.3 CINÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS INDICADORES

Para analizar el efecto de los CE de cada cepa sobre la cinética de crecimiento de los microorganismos indicadores fue necesario establecer una cantidad inicial de unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/mL) a inocular de los microorganismos *S. aureus* y *E. coli*. Esta concentración se logró establecer mediante la siguiente metodología:

6.3.1 Determinación de la cantidad de inóculo inicial

Los microorganismos indicadores: *S. aureus* y *E. coli* conservados en glicerol al 15 % (v/v) a -20 °C, se reactivaron en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm con 10 mL de medio BHI (BD Difco) con incubación a 37 °C durante 24 h (Gravity Convection, Mod. E-71).

Posteriormente se inocularon 200 µL del microorganismo indicador *S. aureus* o *E. coli* a un tubo de ensayo de 16 x 150 mm con 10 mL de medio fresco y se incubaron a 37 °C. La cinética de crecimiento se midió por método espectrofotométrico a una longitud de onda de 600 nm (Perkin-Elmer Lambda 34) y paralelamente se determinaron las UFC/mL mediante la técnica de conteo en placa (Ramírez, *et. al.*, 2006).

La determinación de la concentración inicial de inóculo de los microorganismos iniciadores es muy importante, porque al conocer las UFC/mL iniciales es posible emular el efecto de una probable contaminación, conforme a lo reportado en productos lácteos, o con base en los parámetros tolerables de la presencia de los

microorganismos indicadores (Charlier, *et. al.*, 2008; Muñoz, *et. al.*, 2007; Rodríguez, *et. al.*, 2005).

6.3.2 Efecto de los CE en el medio BHI

En un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio BHI se adicionó el volumen de inóculo que se calculó para *S. aureus* (Ecuación 1), se incubó a 25 °C durante 24 h. Para el caso de *E. coli*, en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio BHI se adicionó el volumen de inóculo que se calculó para dicho microorganismo (Ecuación 2), se incubó a 25 °C durante 34 h. La cinética de crecimiento de ambos microorganismos se determinó por D. O. _{600 nm} y paralelamente se determinaron las UFC/mL mediante la técnica de conteo en placa. Las cinéticas se llevaron a cabo al menos con tres réplicas.

Los CE semipurificados de *Lb. paracasei* y *E. faecalis* se adicionaron de forma independiente a las 16 h de fermentación de *S. aureus*, entre tanto los CE concentrados de *Lb. paracasei* y *E. faecalis* se adicionaron a las 26 h de fermentación de *E. coli*. Ambos tiempos corresponden al inicio de la fase exponencial de cada microorganismo.

En ambos casos se utilizó como control negativo medio MRS estéril, al cual se le ajustó el valor de pH a 7 mediante la adición de NaOH al 50 % (v/v). El neutralizado se filtró con una membrana de 0.45 µm se precipitó con sulfato de amonio al 40 % (p/v) a 4 °C durante 2 h con agitación constante. A continuación se centrifugó a 17000 rpm, durante 30 min a 4 °C el sobrenadante se desechó y el botón se resuspendió en 1.5 mL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) 100 mM a pH 7. Se dializó en una membrana con tamaño de corte de 1 kDa, en 4 L de agua destilada con agitación constante durante 16 h a 4 °C.

6.3.3 Efecto de los CE en el medio lácteo con sal (MLS)

En el MLS previamente diseñado se adicionó el volumen de inóculo que se calculó para *S. aureus* (Ecuación 1) y para *E. coli* (Ecuación 2) independientemente, se incubó a 25 °C durante 32 h. La cinética de crecimiento de ambos microorganismos se determinó mediante la técnica de conteo en placa debido a la naturaleza del medio. Se llevaron a cabo al menos tres réplicas de cada cinética.

Los CE semipurificados se adicionaron en la fase logarítmica de crecimiento de *S. aureus* a las 26 h de forma independiente en diferentes concentraciones de proteína total (1.5 mg/mL, 3 mg/mL y 6 mg/mL).

Los CE concentrados se adicionaron en la fase logarítmica de crecimiento de *E. coli* a las 24 h en diferentes concentraciones de proteína total respectivamente (6 mg/mL, 10 mg/mL y 12 mg/mL). El efecto en el crecimiento de cada microorganismo para cada concentración de proteína adicionada se determinó mediante conteo en placa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El queso Cotija, es un medio de cultivo muy complejo comparado con el medio BHI, principalmente por el alto contenido en grasa. Debido a lo anterior fue necesario diseñar un medio semejante en composición y propiedades fisicoquímicas. Lo cual nos permitió analizar mejor el efecto de los extractos extracelulares de las BAL aisladas del queso Cotija, al ofrecer un modelo más cercano al producto de interés en cuanto a composición y propiedades.

7.1 FORMULACIÓN Y PROPIEDADES DEL MEDIO LÁCTEO CON SAL (MLS)

En la Tabla 4 se denota la composición del medio lácteo con sal (MLS) que se diseñó a partir de leche entera UHT. Se observa que MLS diseñado obtuvo una composición química similar a la materia prima utilizada en la elaboración del queso Cotija, acorde con las reglas de uso y datos reportados en trabajos previos del grupo de trabajo (Álvarez, *et. al.*, 2005; Hernández-Briones, 2007).

Tabla 4. Comparación de la composición química reportada para la cuajada producida en la elaboración del queso Cotija y la composición química del medio lácteo con sal (MLS).

Componente	Cuajada ¹	MLS
	% (p / v)	
Carbohidratos	No reportado	4.80
Lípidos	3.70	3.40
Proteínas	3.00	3.10
Sal de grano	5.00	5.00

¹ Hernández-Briones, 2007

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos se muestra en la Tabla 5 que los valores obtenidos para el MLS están dentro de los intervalos reportados para la cuajada. La adición de sal de grano a la leche permite emular el a_w reportado.

Tabla 5. Comparación de los parámetros fisicoquímicos reportados para la cuajada producida en la elaboración del queso Cotija y la composición química del medio lácteo con sal (MLS).

Parámetro	Cuajada ¹	MLS
% acidez	0.14 a 0.16	0.14
pH	6 a 7	6.36
a_w	0.90 a 0.99	0.946

¹ Hernández-Briones, 2007

La composición química del medio provee de nutrientes aprovechables por varios microorganismos. En tanto que la concentración de sal de grano y los parámetros fisicoquímicos limitan el desarrollo de muchos de estos microorganismos patógenos.

Sin embargo, *S. aureus* es osmotolerante a concentraciones de 3 M de cloruro de sodio (Prescott, 2002) y la acidez del medio no afecta su desarrollo (Charlier, *et. al.* 2008). También *E. coli* puede desarrollarse, al ser tolerante a esa concentración de sal, valores de pH y porcentaje de acidez (Michanie, 2003).

Estas características hicieron idóneo el medio MLS para los objetivos de estudio, al ofrecer parámetros similares a los reportados para la cuajada del queso Cotija y condiciones donde fuera posible el crecimiento de los microorganismos indicadores.

7.2 OBTENCIÓN DE LOS COMPUESTOS EXTRACELULARES (CE)

En estudios previos del grupo de trabajo se demostró que una cepa de *Lb. paracasei* y una cepa de *E. faecalis* aisladas del queso Cotija producían compuestos extracelulares con actividad antibacteriana, al ser cultivadas en medio MRS. En ambos

casos los compuestos se producían en las fases estacionarias tempranas, respectivamente. Este efecto se demostró para los extractos crudos concentrados mediante las técnicas de difusión en agar y microplaca (Hernández-Alcántara, 2010; Delgado-Arciniega, en revisión).

Por tanto, se obtuvieron los sobrenadantes de estas cepas bajo las condiciones de crecimiento previamente reportadas en medio MRS. Con la metodología descrita anteriormente (ver métodos 6.2) se logró semipurificar a los compuestos extracelulares.

Por los reportes previos se sabe que:

- a) Las cepas de *Lb. paracasei* como la de *E. faecalis* aisladas son homofermentativas (Salminen, *et. al.*, 2004), es decir, no se genera otro ácido orgánico, etanol, o peróxido de hidrógeno durante la fermentación.
- b) Se empleó un proceso de neutralización de los sobrenadantes que descarta el efecto del ácido láctico producido en la fermentación.
- c) Se realizó una precipitación con sulfato de amonio, que es un método ampliamente utilizado para la separación de proteínas en extractos crudos, como una fase preparativa para técnicas más selectivas (King, 1972).

Con base en lo anterior es válido suponer que los compuestos extracelulares obtenidos son de naturaleza proteínica. Por lo que se determinó su perfil electroforético y su actividad lítica por zimogramas.

7.2.1 Perfil electroforético y actividad lítica

El perfil electroforético se determinó por geles SDS-Tris-Tricine-PAGE al 12 %. Con la finalidad de establecer una comparación clara de los CE semipurificados se aplicaron como controles tanto para el perfil electroforético como para los zimogramas Nisaplin[®] y el medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación. Ya que se sabe

que el Nisaplin® tiene efecto inhibitorio contra microorganismos gram-positivos al impedir el transporte de moléculas de peptidoglucano y evitar la formación de la pared celular (Delves-Broughton, 2007).

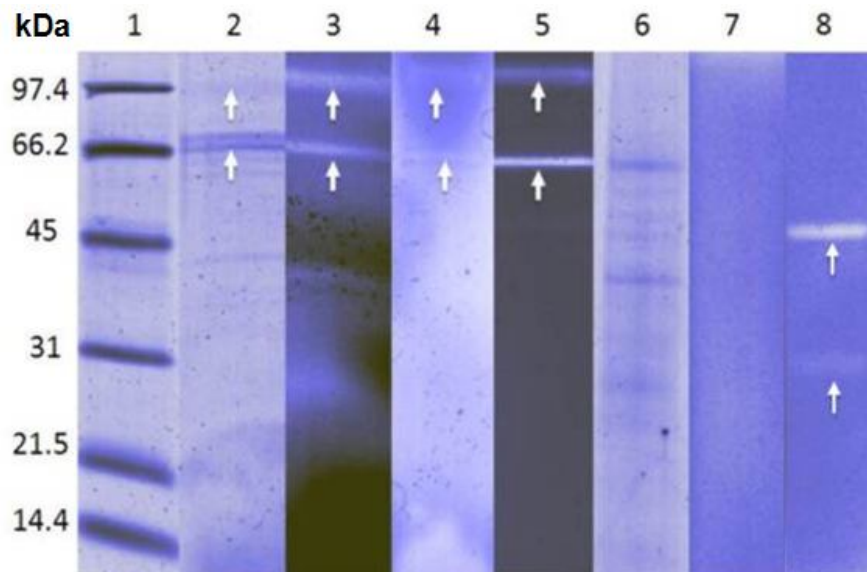


Figura 4. Perfil electroforético de CE de *Lb. paracasei* y zimogramas en gel tris-tricina 12 %. (1) Marcador de peso molecular (2) CE semipurificados de la cepa de *Lb. paracasei* en gel tris-tricina 12 % (3) Zimograma contra *S. aureus* (4) Zimograma contra *E. coli* (5) Zimograma contra *M. lysodeikticus* (6) Control negativo medio MRS en gel tris-tricina 12 % (7) Control negativo MRS en zimograma contra *M. lysodeikticus* (8) Control positivo Nisaplin® en zimograma contra *M. lysodeikticus*. Carriles 1, 2 y 6 teñidos con azul de Coomasie, zimogramas teñidos con azul de metileno.

En los geles de perfil electroforético (Figura 4) se observó que los CE semipurificados de la cepa de *Lb. paracasei* presentaron una banda intensa con un peso aproximado de 68 kilodaltones (kDa). La banda de 68 kDa coincide con una de las bandas de actividad en los zimogramas contra *S. aureus*, *E. coli* y *M. lysodeikticus*. Sin embargo, en los zimogramas también se denotó una banda definida con un peso aproximado de 98 kDa, la cual se observó tenue en el gel de perfil electroforético.

Ambas bandas de actividad difieren en cuanto a tamaño de las hidrolasas de pared celular reportadas para el género *Lactobacillus*, de un peso aproximado entre los 33 y 34 kDa con actividad lítica (NCBI, 2010. No. de acceso: ZP_03943628.1 y AAS57574.1). No obstante las bandas con actividad lítica encontradas son equiparables

en cuanto al peso molecular reportado para una peptidoglucano hidrolasa de una cepa de *Lb. delbruekii* subsp. *bulgaricus*. Esta enzima tiene un peso molecular de 80 kDa y su actividad lítica fue determinada por zimografía empleando como sustrato células del microorganismo *M. lysodeikticus* (Kang, *et. al.*, 2003).

No fue posible observar actividad lítica en zimogramas para los CE semipurificados de la cepa de *E. faecalis*. Excepto una banda difusa que se distinguió para el zimograma de *M. lysodeikticus* a los 88 kDa coincidente con la banda observada en el perfil electroforético (Figura 5). El peso molecular que evidencia esta banda de actividad es comparable al peso que se reporta para varias hidrolasas de la pared celular de bacterias (promedio de 77 kDa) encontradas en algunas cepas de *E. faecalis* (NCBI, 2010. No. de acceso: ZP_05575418.1, ZP_05578079.1 y ZP_05580515.1).

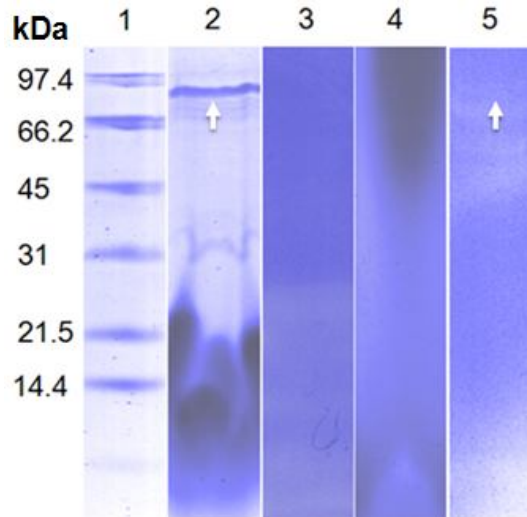


Figura 5. Perfil electroforético de CE de *E. faecalis* y zimogramas. (1) Marcador de peso molecular (2) Compuestos extracelulares semipurificados de la cepa de *E. faecalis* en gel tris-tricina 12 % teñidos con azul de Coomasie (3) Zimograma contra *S. aureus* (4) Zimograma contra *E. coli* (5) Zimograma contra *M. lysodeikticus*. Los zimogramas fueron teñidos con azul de metileno.

Los pesos moleculares que presentaron los CE indican que no se podrían considerar bacteriocinas, ya que éstas son péptidos de bajo peso molecular y termoestables (Cotter, *et. al.*, 2005). Sin embargo, debido al comportamiento en el

zimograma y gel electroforético es posible suponer que son compuestos de naturaleza proteínica.

Los resultados que se obtuvieron para los CE semipurificados de *Lb. paracasei* sugieren que podría existir actividad lítica contra microorganismos indicadores. Por tanto, se decidió aplicarlos en cultivos de dos de estos microorganismos: *S. aureus* y *E. coli*.

En el caso de los resultados para los CE semipurificados de *E. faecalis* no se observó claramente la actividad en zimogramas. Pero sí se aplicaron en los cultivos de *S. aureus* y *E. coli*, con fundamento en estudios previos del grupo de trabajo (Hernández-Alcántara, 2010; Delgado-Arciniega, 2010).

7.3 CINÉTICA DE LOS MICROORGANISMOS INDICADORES

Los microorganismos indicadores que se utilizaron fueron *S. aureus* y *E. coli*. *S. aureus* es un microorganismo gram-positivo, de interés a nivel de salud pública porque es capaz de producir una poderosa enterotoxina que al ingerirse causa intoxicaciones alimentarias (Muñoz, *et. al.*, 2007; Murray, *et. al.*, 2006; NOM-115-SSA1-1994). Mientras que *E. coli* es un microorganismo gram-negativo, generalmente un indicador de contaminación fecal, se considera además la bacteria aerobia responsable con mayor frecuencia de las enfermedades intestinales (Murray, *et. al.*, 2006).

Con base en lo anterior, se utilizaron estos microorganismos patógenos como representativos de los géneros gram-positivo (*S. aureus*) y gram-negativo (*E. coli*). Ambos microorganismos tienen trascendencia en los productos lácteos debido a su alta incidencia (Rodríguez, *et. al.*, 2005) y en leche bronca también se ha reportado su presencia (Rodríguez, *et. al.*, 2000).

Además de que en el proceso de elaboración del queso Cotija, no se contempla un tratamiento térmico, el cual es un método efectivo para la eliminación de muchos microorganismos patógenos, incluidos *S. aureus* y *E. coli*.

7.3.1 Determinación de la cantidad de inóculo inicial

El efecto de los extractos extracelulares se probó sobre una cantidad definida de microorganismos indicadores (aproximadamente 1×10^4 UFC/mL) que se inocularon en los sistemas correspondientes. Esta concentración se definió en función de la necesaria para considerarse una contaminación representativa de un producto lácteo (Charlier, *et al.*, 2008; Rodríguez, *et al.*, 2005).

Bajo las condiciones descritas previamente en la metodología, la determinación de la cantidad de inóculo inicial de los microorganismos indicadores se obtuvo a partir de que se correlacionó la densidad óptica en la fase logarítmica de crecimiento con la concentración de células viables en la misma (Figuras 6, 7, 8 y 9).

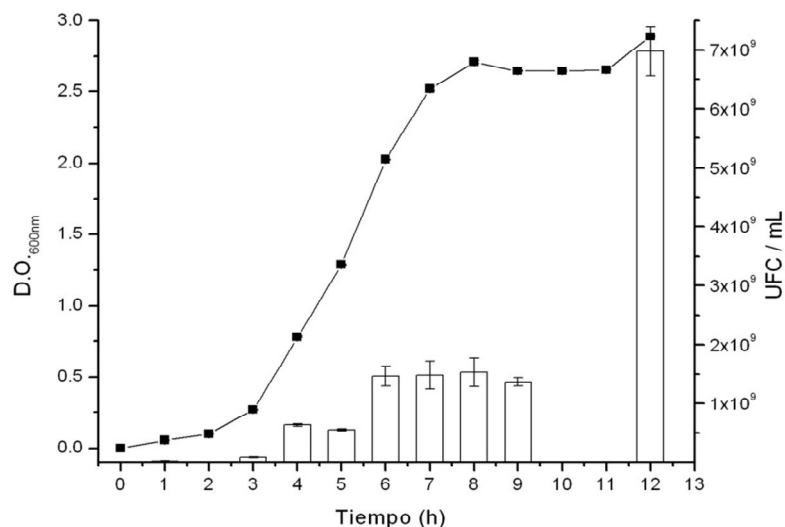


Figura 6. Cinética de crecimiento de inóculo de *S. aureus* en medio BHI a 37 °C sin agitación. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

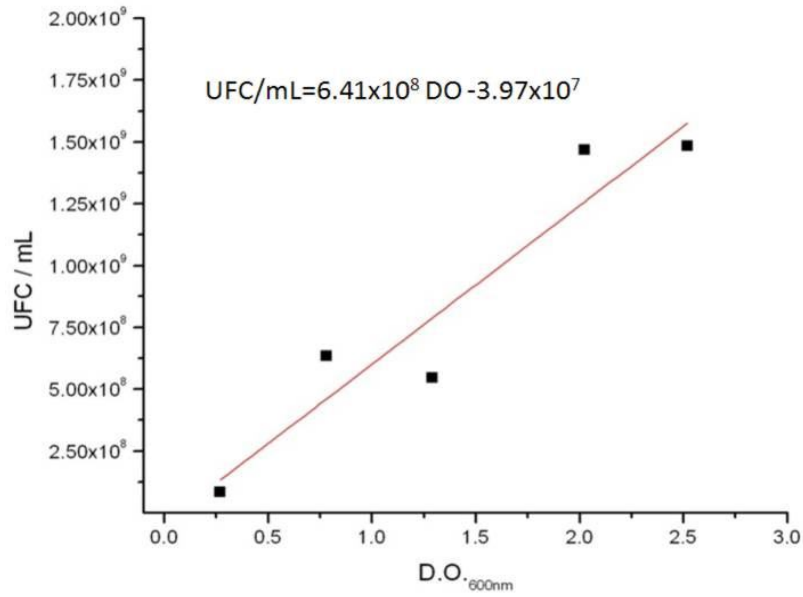


Figura 7. Correlación de la densidad óptica con UFC/mL en la fase logarítmica de crecimiento de *S. aureus*.

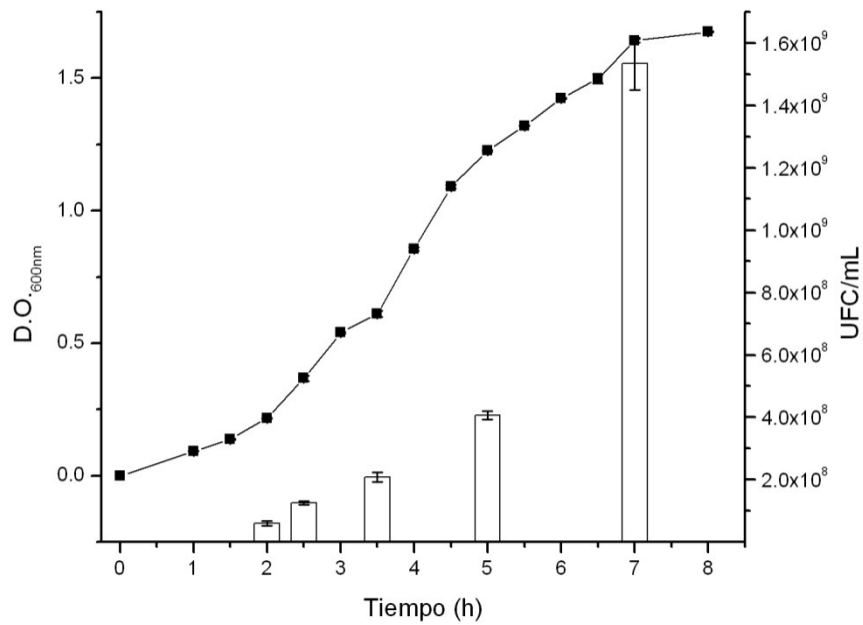


Figura 8. Cinética de crecimiento de inóculo de *E. coli* en medio BHI a 37 °C sin agitación. Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

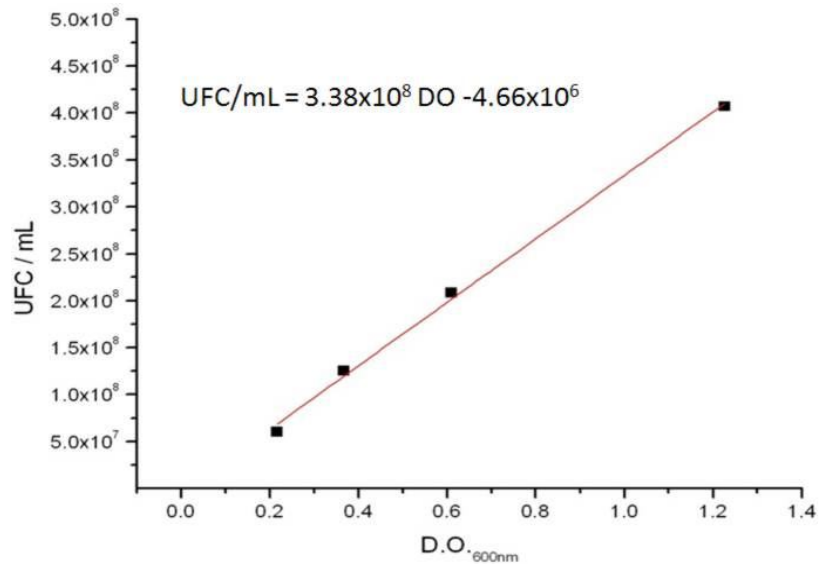


Figura 9. Correlación de la densidad óptica con UFC/mL en la fase logarítmica de crecimiento de *E. coli*.

Con las correlaciones anteriores se calculó el volumen de inóculo inicial de *S. aureus* o *E. coli* respectivamente que se adicionó a cada sistema de acuerdo con las Ecuaciones 1 y 2. Se consideró un volumen de fermentación de 50 mL del medio respectivo dependiendo la prueba, y una concentración inicial teórica esperada de 1×10^4 UFC/mL de acuerdo a los motivos previamente expuestos.

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{(50 \text{ mL})(1 \times 10^4 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}})}{6.41 \times 10^8 \text{ DO} - 3.97 \times 10^7}$$

Ecuación 1. Ecuación que se utilizó para determinar el volumen de inóculo que se adicionó de *S. aureus* a las fermentaciones correspondientes.

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{(50 \text{ mL})(1 \times 10^4 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}})}{3.38 \times 10^8 \text{ DO} - 4.66 \times 10^6}$$

Ecuación 2. Ecuación que se utilizó para determinar el volumen de inóculo que se adicionó de *E. coli* a las fermentaciones correspondientes.

Como ejemplo, para *S. aureus* se midió la D.O._{600 nm} en la mitad de la fase exponencial de su cinética de crecimiento (5 h), la cual fue de 0.845 (Figura 6).

Con este valor se calculó el volumen de inóculo inicial acorde con la Ecuación 1, a partir de evaluar la D.O. $_{600\text{ nm}}$ en la correlación de la densidad óptica con UFC/mL. Posteriormente, el resultado obtenido se utilizó como divisor del producto del volumen de fermentación por la concentración de inóculo teórica:

$$V_{\text{inóculo}} = \frac{(50\text{ mL}) \left(1 \times 10^4 \frac{\text{UFC}}{\text{mL}} \right)}{6.41 \times 10^8 (0.845) - 3.97 \times 10^7} = 9.96 \times 10^4 \text{ mL}$$

El volumen calculado de inóculo se adicionó al sistema respectivo para cada medio (BHI o MLS) y se corroboró la cantidad de UFC/mL en tiempo cero a través de conteo en placa.

7.3.2 Efecto de los CE en el medio BHI

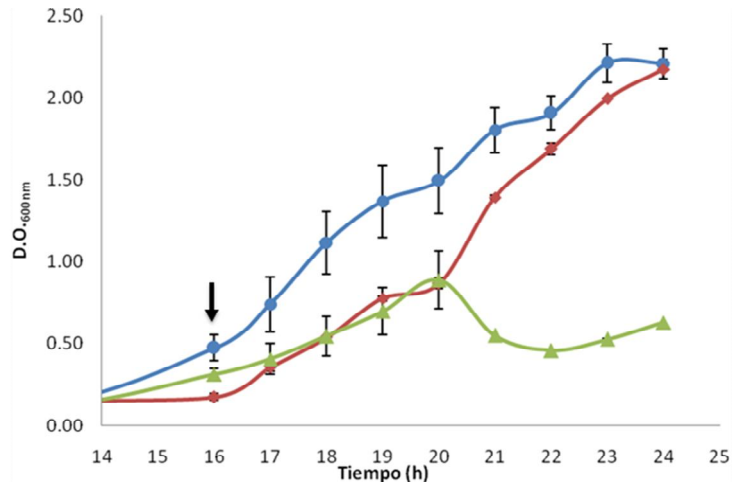
Se empleó el medio comercial BHI, para el crecimiento de los microorganismos indicadores. La elección del medio fue debido a que se usó en los ensayos previos del grupo de trabajo (Delgado-Arciniega, en revisión). Así como en las pruebas presuntivas de difusión en agar donde se determinó el efecto antibacteriano de estos compuestos extracelulares (Hernández-Alcántara, 2010).

El medio BHI nos permitió monitorear paralelamente el crecimiento de los microorganismos indicadores por densidad óptica y por conteo en placa. También permitió observar el efecto de los extractos extracelulares de las cepas de BAL en un sistema óptimo en cuanto a nutrientes, pero incubados a una temperatura promedio de maduración del queso Cotija (25 °C).

El efecto sobre *S. aureus* de los CE semipurificados de la cepa de *Lb. paracasei* con una concentración de 6 mg/mL de proteína total se muestran en la Figura 10. Para comprobar que el medio MRS por sí mismo no ejerciera un efecto inhibitorio en el

crecimiento de *S. aureus*, se utilizó éste tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación y se adicionó a las 16 h, de igual forma que los CE semipurificados.

(A)



(B)

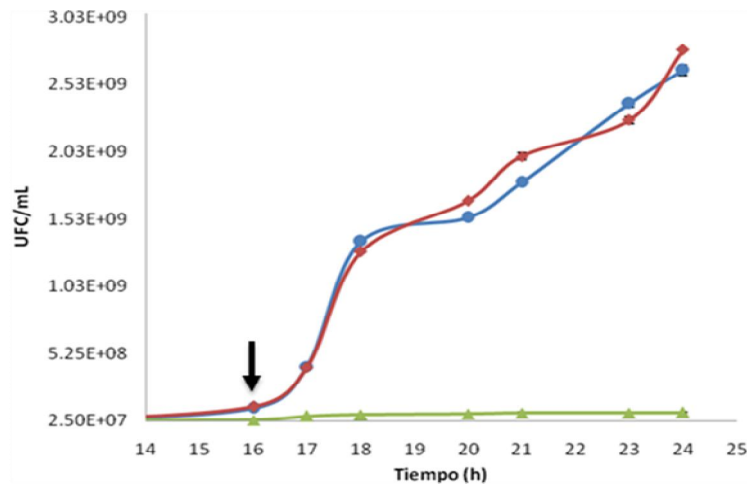
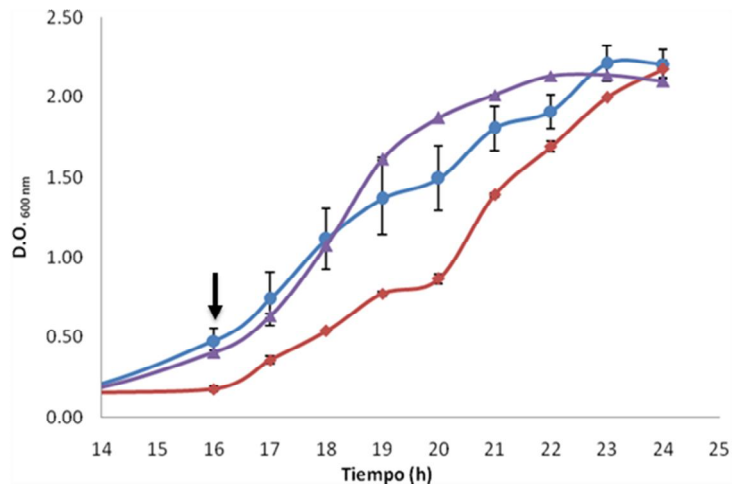


Figura 10. Cinética de crecimiento de *S. aureus* en medio BHI incubado a 25 °C. (A) Por densidad óptica (B) Se determinaron UFC/mL. *S. aureus* sin adición de CE semipurificados (●), medio MRS (◆), CE semipurificados de *Lb. paracasei* 6 mg/mL de proteína total (▲); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Los CE semipurificados de *Lb. paracasei* con una concentración de proteína de 6 mg/mL manifestaron un efecto inhibitorio de tipo bacteriostático sobre *S. aureus* en medio BHI. Se redujeron en promedio, veinte veces las UFC/mL en comparación con el comportamiento control de *S. aureus* en medio BHI en su fase logarítmica.

Para observar el efecto de los CE de la cepa de *E. faecalis* sobre *S. aureus* se realizó la misma metodología previamente descrita, los resultados se muestran en la Figura 11.

(A)



(B)

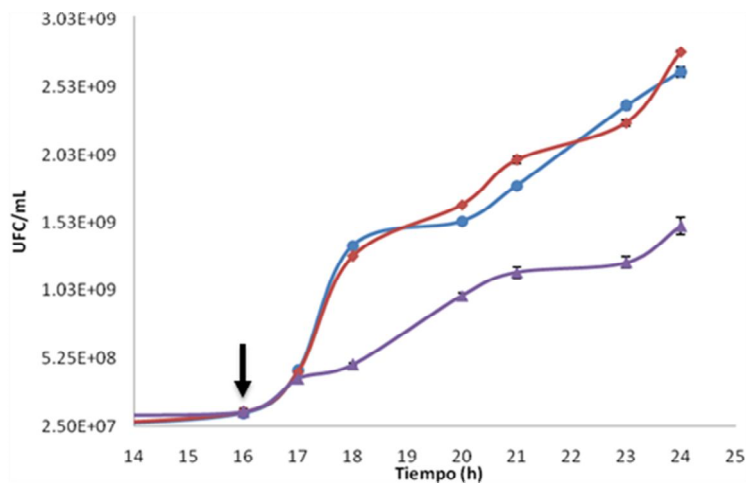


Figura 11. Cinética de crecimiento de *S. aureus* en medio BHI incubado a 25 °C. (A) Por densidad óptica (B) Se determinaron UFC/mL. *S. aureus* sin adición de CE semipurificados (●), medio MRS (◆), CE semipurificados de *E. faecalis* 6 mg/mL de proteína total (▲); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

La cinética de crecimiento monitoreada a través de la D.O._{600 nm} mostró alta variabilidad. El efecto de los CE semipurificados de *E. faecalis* no es claro, pudiendo

considerarse nulo. Por otra parte, el medio MRS manifestó un efecto sobre el crecimiento, aparentemente de disminución.

Sin embargo, al analizar las gráficas de UFC/mL en función del tiempo el resultado fue más claro y se denotó que el medio MRS no tiene efecto alguno sobre el crecimiento de *S. aureus*, en las condiciones de cultivo estudiadas. Por tanto, para nuestra finalidad el método que resultó más eficiente para determinar el efecto de los concentrados sobre un microorganismo indicador en estas condiciones, es la técnica de conteo en placa.

Consecuentemente, se puede decir que disminuyeron las UFC/mL aproximadamente 50 % comparadas con las obtenidas en el comportamiento control de *S. aureus*, manteniendo esta proporción durante toda la cinética de crecimiento.

En el caso de *E. coli*, los CE semipurificados (precipitados con sulfato de amonio y dializados) no mostraron un efecto notable pese a la alta concentración de proteína utilizada en este ensayo, por lo cual, se adicionaron los CE concentrados no semipurificados (sólo liofilizados). Para la cepa de *Lb. paracasei* se adicionaron 10 mg/mL de proteína de los CE concentrados y para la cepa de *E. faecalis* se adicionaron 6 mg/mL (Figuras 12 y 13) ambos a las 26 h de fermentación (inicio de la fase exponencial).

Como se puede apreciar en la Figura 12 el comportamiento de las fermentaciones donde se adicionaron los CE semipurificados y los CE concentrados de la cepa de *Lb. paracasei* (10 mg/mL) es muy similar entre sí, y a su vez, con el control. Fue hasta las 34 h donde se observó una disminución notable de las UFC/mL para la fermentación en la que se adicionaron los CE semipurificados.

En la Figura 13 el efecto inhibitorio que causaron los CE concentrados de la cepa de *E. faecalis* es un poco más evidente en comparación con los CE semipurificados. No obstante a las 34 h, las UFC/mL de ambos tratamientos son similares.

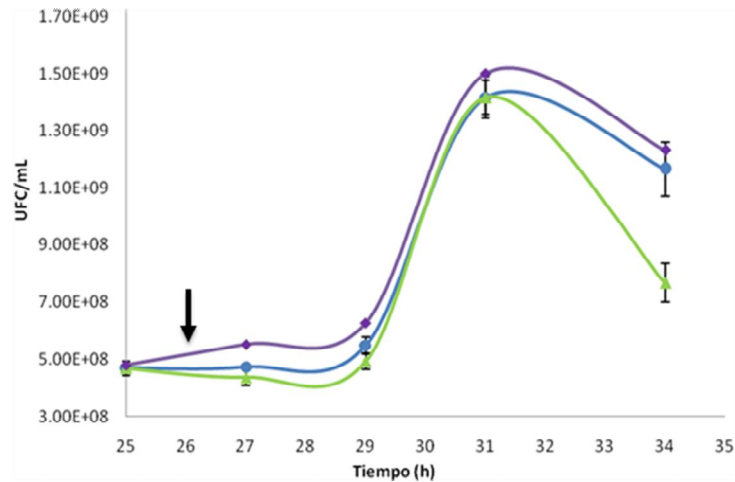


Figura 12. Cinética de crecimiento de *E. coli* en medio BHI incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE semipurificados (●), CE concentrados de *Lb. paracasei* 10 mg/mL (◆), CE semipurificados de *Lb. paracasei* 10 mg/mL (▲); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

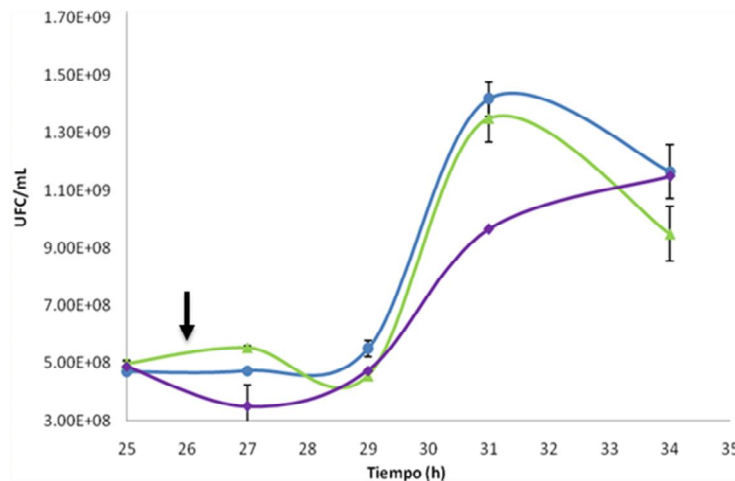


Figura 13. Cinética de crecimiento de *E. coli* en medio BHI incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE semipurificados (●), CE concentrados de *E. faecalis* 6 mg/mL (◆), CE semipurificados de *E. faecalis* 6 mg/mL (▲); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

7.3.3 Efecto de los CE en el medio lácteo con sal (MLS)

Con los antecedentes del efecto observado para ambos microorganismos indicadores (*S. aureus* y *E. coli*) en medio BHI, se procedió a comprobar el efecto que presentarían los compuestos extracelulares en un medio con características similares a

la cuajada del queso Cotija. Se aplicaron tanto los CE concentrados como semipurificados de las cepas de *Lb. paracasei* y *E. faecalis* contra los mismos microorganismos indicadores.

Es importante señalar que la cinética de crecimiento de *S. aureus* en medio MLS tuvo una fase lag mayor, aproximadamente 8 h más que en el medio BHI, dadas las condiciones y composición del mismo. Sin embargo, la fase lag de la cinética de crecimiento de *E. coli* es muy semejante para ambos medios de cultivo.

Pese a que ambos microorganismos indicadores son halotolerantes y se desarrollan a la concentración de NaCl del medio MLS, los nutrientes y su disponibilidad varían con respecto al BHI. Principalmente, en lo que se refiere al contenido de grasa y parámetros fisicoquímicos del medio MLS, que se asemejan a la cuajada del queso Cotija.

Al medio MLS inoculado con *S. aureus*, se le adicionaron 6 mg/mL de los CE semipurificados de la cepa de *Lb. paracasei*. Dado que con esta concentración se observó la mayor inhibición del crecimiento en medio BHI. En este experimento los CE se adicionaron a las 26 h, debido a la cinética de crecimiento en este medio (Figura 14).

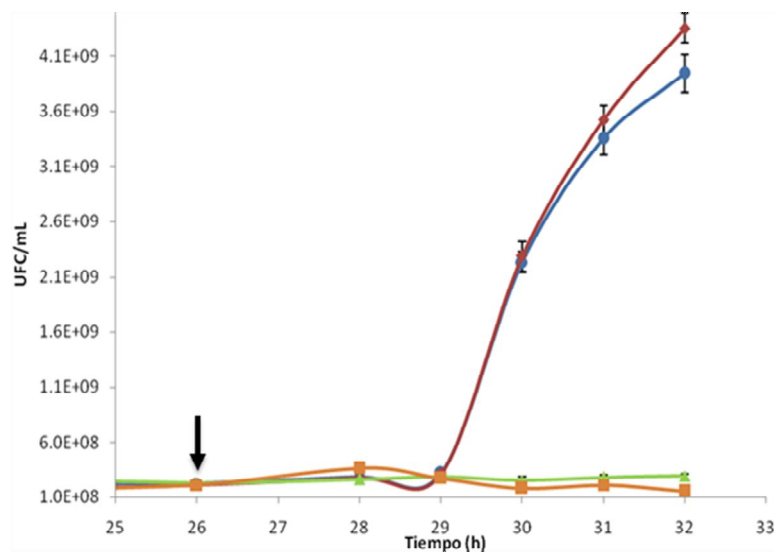


Figura 14. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *Lb. paracasei* 6 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin® 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Nuevamente se emplearon Nisaplin[®] y medio MRS, tratado bajo la metodología de semipurificación de los CE, como controles. Se comprobó que el Nisaplin[®] es un antimicrobiano altamente efectivo contra bacterias gram-positivas, como *S. aureus* (Delves-Broughton, 2007). En tanto el resultado negativo de la adición del medio MRS aseguró que el efecto antibacteriano fue de los CE y no del medio de cultivo donde se produjeron.

Se observó un efecto inhibitorio similar en medio MLS, al determinado en medio BHI para los CE semipurificados de la cepa de *Lb. paracasei* (Figura 10 vs. Figura 14).

Se probaron dos concentraciones adicionales de proteína: 3 mg/mL (Figura 15) y 1.5 mg/mL (Figura 16). Lo cual permitió establecer que el efecto está determinado por la concentración de proteína y que la mayor inhibición de *S. aureus* se logró con 6 mg/mL, adicionados a las 26 h de fermentación en el medio lácteo.

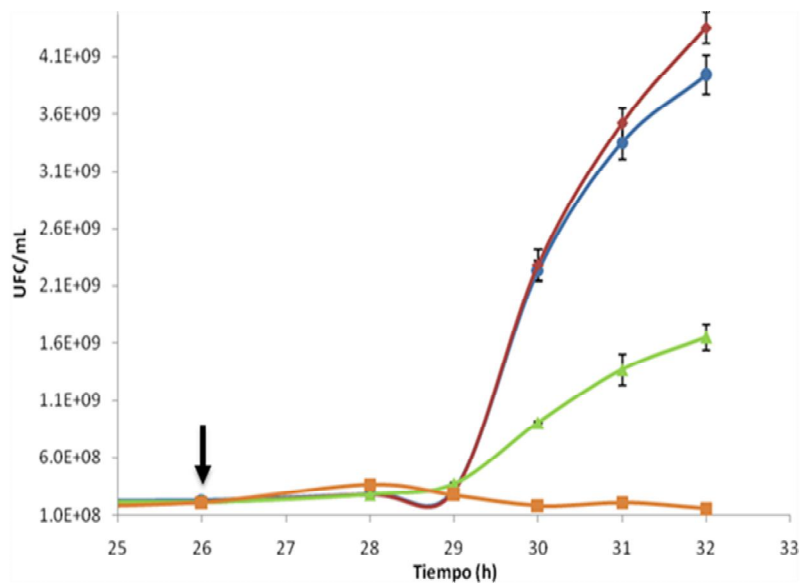


Figura 15. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *Lb. paracasei* 3 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin[®] 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

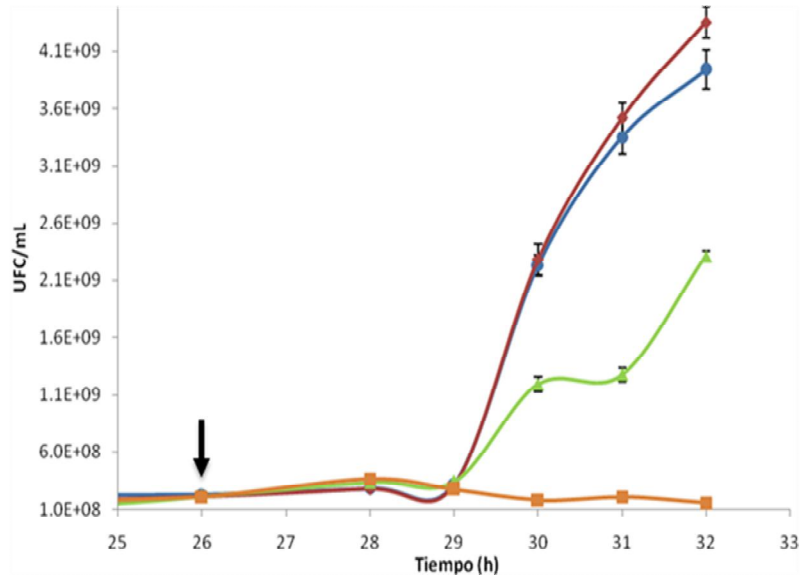


Figura 16. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *Lb. paracasei* 1.5 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin® 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

La metodología y el tratamiento de los datos antes descritos se aplicaron igualmente para los CE semipurificados de la cepa de *E. faecalis* (Figuras 17, 18 y 19).

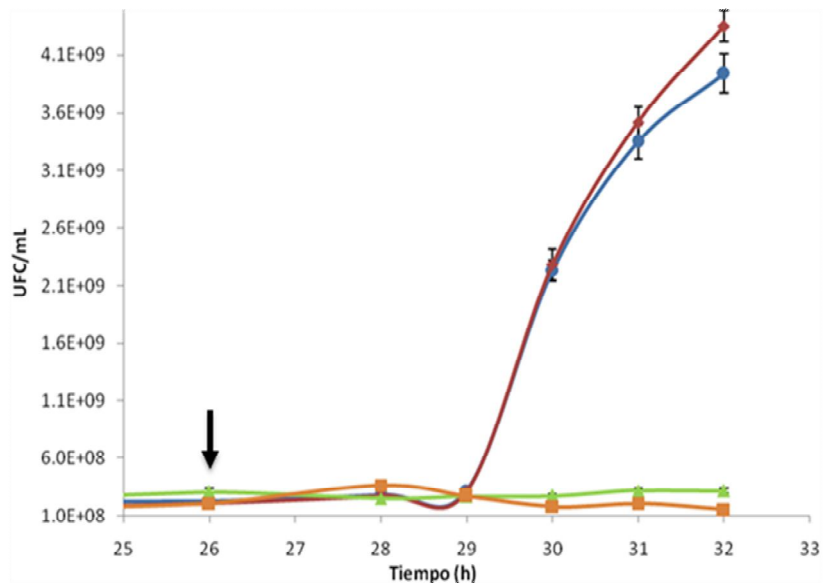


Figura 17. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *E. faecalis* 6 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin® 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

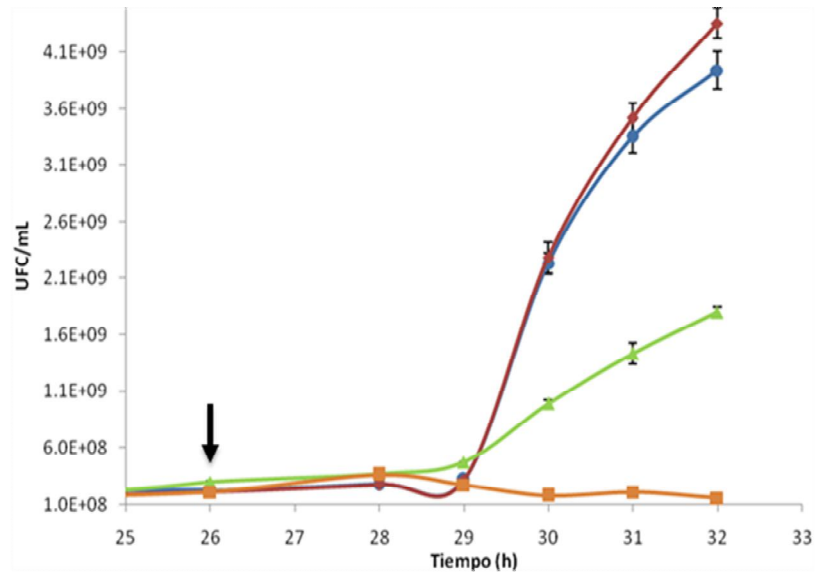


Figura 18. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *E. faecalis* 3 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin® 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

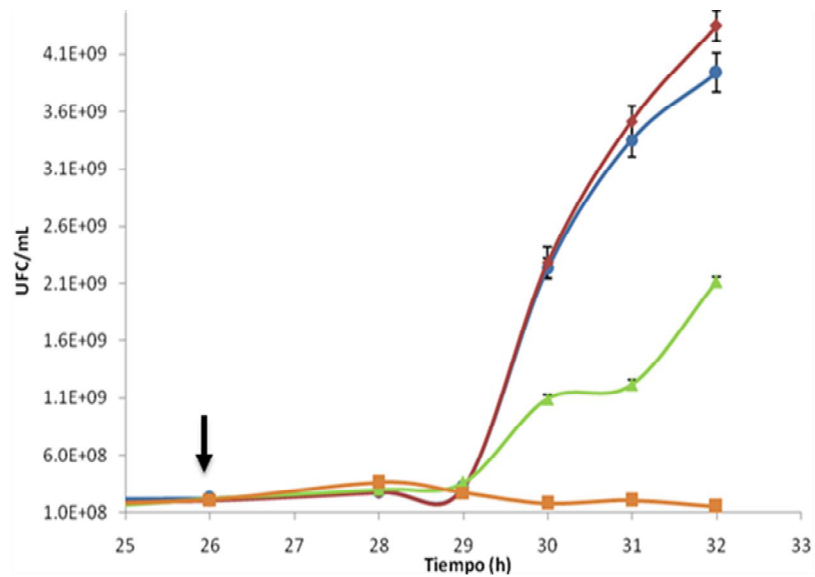


Figura 19. Cinética del microorganismo indicador *S. aureus* en medio MLS incubado a 25 °C. *S. aureus* sin adición de CE (●); CE semipurificados de *E. faecalis* 1.5 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones de semipurificación (◆); control positivo Nisaplin® 1.5 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Se aprecia un comportamiento similar sobre el microorganismo indicador *S. aureus* a las diferentes concentraciones de proteína adicionadas, para los CE semipurificados

de la cepa de *E. faecalis*. Consecuentemente, el efecto bacteriostático está dado por la concentración de proteína adicionada al cultivo.

Para analizar el efecto sobre de *E. coli* en medio MLS, se decidió adicionar 10 mg/mL de los CE concentrados de la cepa de *Lb. paracasei*, porque en el medio BHI no se observó un efecto notorio con los CE semipurificados. La adición de los CE concentrados fue a las 24 h de fermentación (Figura 20). Se utilizó Kanamicina como control positivo, pues este antibiótico tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de bacterias gram-negativas, tal es el caso de *E. coli* (Murray, *et. al.*, 2006).

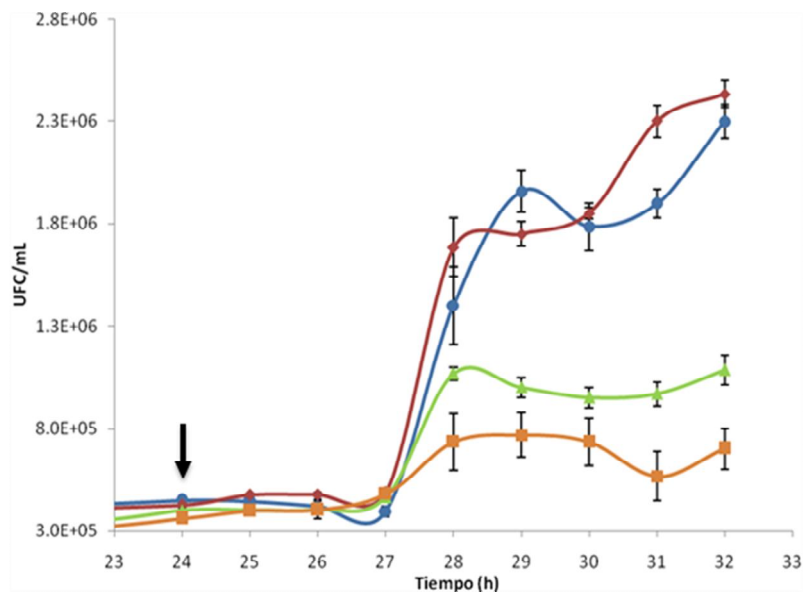


Figura 20. Cinética del microorganismo indicador *E. coli* en medio MLS incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE (●); CE concentrados de *Lb. paracasei* 10 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones que los CE (◆); control positivo Kanamicina® 2 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

El efecto inhibitorio de tipo bacteriostático que se obtuvo es más notable en el medio MLS que en el medio BHI, con la misma cantidad de CE concentrados (10 mg/mL). Por otra parte, se aplicó una concentración de 12 mg/mL de CE concentrados bajo las mismas condiciones (Figura 21) para analizar la influencia de la concentración de proteína sobre el efecto inhibitorio.

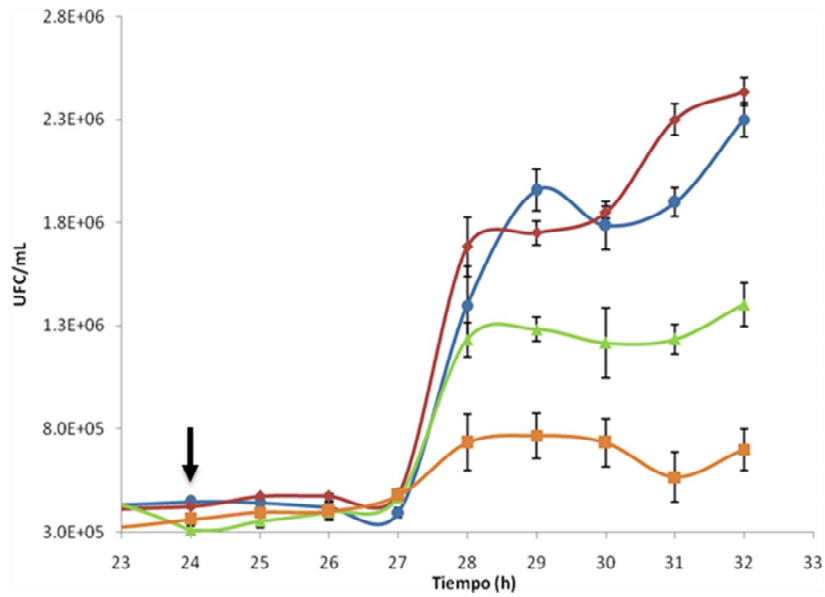


Figura 21. Cinética del microorganismo indicador *E. coli* en medio MLS incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE (●); CE concentrados de *Lb. paracasei* 12 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones que los CE concentrados (◆); control positivo Kanamicina® 2 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

El efecto inhibitorio fue similar con concentraciones de 10 mg/mL y 12 mg/mL de CE concentrados de la cepa de *Lb. paracasei*.

En el caso de los CE concentrados de la cepa *E. faecalis* se adicionó 6 mg/mL a las 24 h de la cinética de crecimiento de *E. coli* (Figura 22) y posteriormente debido al efecto mostrado se probó una mayor concentración de proteína: 12 mg/mL (Figura 23).

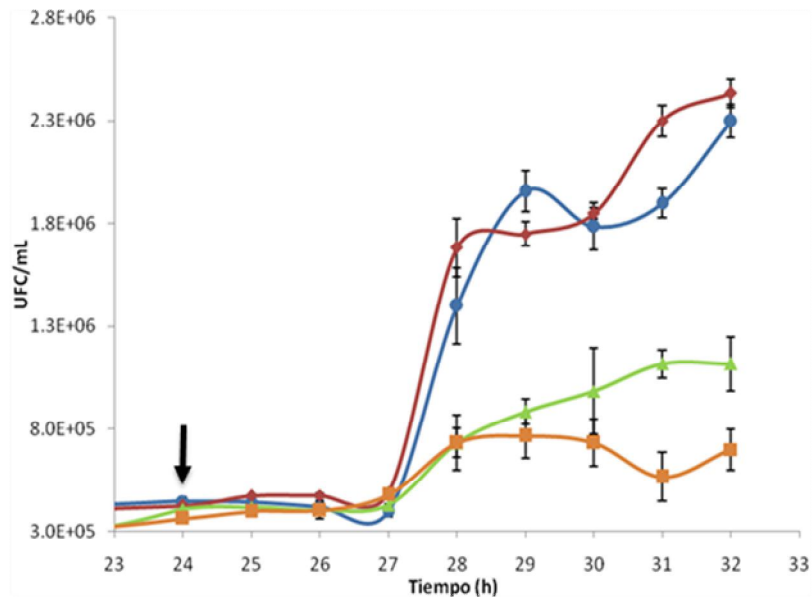


Figura 22. Cinética del microorganismo indicador *E. coli* en medio MLS incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE (●); CE concentrados de *E. faecalis* 6 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones que los CE concentrados (◆); control positivo Kanamicina® 2 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

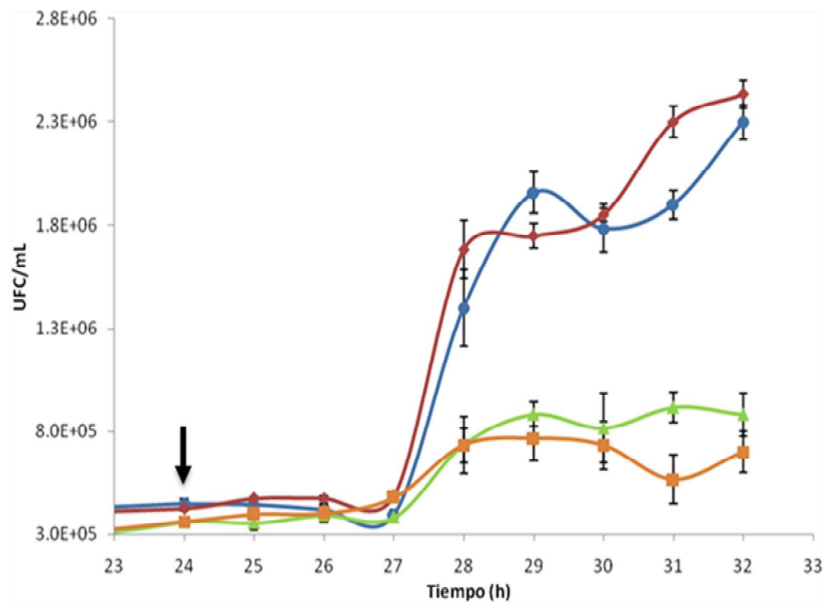


Figura 23. Cinética del microorganismo indicador *E. coli* en medio MLS incubado a 25 °C. *E. coli* sin adición de CE (●); CE concentrados de *E. faecalis* 12 mg/mL (▲); medio MRS tratado bajo las mismas condiciones que los CE concentrados (◆); control positivo Kanamicina® 2 mg/mL (■); adición de los CE (↓). Se muestra el promedio y la desviación estándar de al menos tres réplicas.

Al aumentar al doble la concentración de proteína que se adicionó de los CE concentrados de la cepa de *E. faecalis*, no se observa un cambio importante en la disminución de UFC/mL de *E. coli*.

Los reportes de sustancias antibacterianas producidas por cepas del género *Lactobacillus* y *Enterococcus* generalmente hacen referencia a bacteriocinas (Muñoz, *et. al.*, 2007; Todorov y Dicks, 2007; Rodríguez, *et. al.*, 2000) y ácidos orgánicos (Alvarado, *et. al.*, 2006; Vallejo, *et. al.*, 2009), entre otras.

El tratamiento que se aplicó a los extractos extracelulares y la metodología de semipurificación descarta la presencia de ácidos orgánicos. Además, por los resultados previos de actividad lítica y perfil electroforético, se puede asegurar que no se trata de bacteriocinas. Sin embargo, los responsables del efecto antibacteriano, son compuestos de naturaleza proteínica con una actividad bacteriostática.

Para *S. aureus*, los resultados indican un efecto bacteriostático similar al que presenta el Nisaplin® en el medio MLS, con una concentración de proteína total de 6 mg/mL para ambas cepas.

Para *E. coli* el efecto inhibitorio sólo se observó con los CE concentrados de la cepa de *Lb. paracasei* (10 mg/mL de proteína total). En el caso de los CE concentrados de la cepa de *E. faecalis* el mayor efecto inhibitorio fue con 6 mg/mL y no cambia con 12 mg/mL.

8. CONCLUSIONES

Los compuestos extracelulares con actividad lítica de ambas cepas (*Lb. paracasei* y *E. faecalis*) son de origen proteínico.

La cepa de *Lb. paracasei* mostró dos bandas con actividad lítica contra *S. aureus*, *E. coli* y *M. lysodeikticus*, con pesos moleculares aproximados de 68 y 98 kDa.

La cepa de *E. faecalis* mostró una banda de actividad lítica contra *M. lysodeikticus*, con un peso aproximado de 88 kDa.

El medio lácteo con sal (MLS) que se diseñó fue similar en aspectos de composición general y características fisicoquímicas a la materia prima que se utiliza en la elaboración del queso Cotija. Lo que permitió el estudio del crecimiento de los microorganismos indicadores más cercano a las condiciones del producto original.

Los compuestos extracelulares (CE) semipurificados que se obtuvieron de las cepas de *Lb. paracasei* y *E. faecalis*, inhibieron el crecimiento de *S. aureus* a concentraciones de 1.5 y 3 mg/mL; y se observó un efecto bacteriostático al adicionar 6 mg/mL en MLS, a 25 °C

Los compuestos extracelulares (CE) concentrados de la cepa de *Lb. paracasei* tuvieron un efecto bacteriostático indistinto contra *E. coli* en concentraciones de 10 mg/mL y 12 mg/mL en MLS, a 25 °C.

En tanto que los CE concentrados de la cepa de *E. faecalis* tuvieron efecto bacteriostático en concentraciones de 6 mg/mL y 12 mg/mL indistintamente en MLS, a 25 °C.

9. PERSPECTIVAS

Implementar la purificación completa de los compuestos extracelulares de las cepas de BAL estudiadas, lo que permitirá analizarlas y aplicarlas comercialmente.

Generar un espectro antibacteriano de los CE de cada una de las cepas.

Secuenciar las bandas obtenidas en el perfil electroforético para conocer su identidad y poder realizar un análisis bioquímico más detallado.

Conocer si compuestos similares a los que se obtuvieron son producidos directamente en el queso Cotija por las BAL presentes y analizar su efecto antibacteriano.

Aplicar los CE obtenidos en una pieza de queso Cotija como posible bioconservador y analizar su efecto sobre microorganismos patógenos inoculados premeditadamente.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado C., García-Almendárez B. E., Martín S. E. and Regalado C. (2006). Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. *Revista Latinoamericana de Microbiología ALAM*. 48:260-268.
- Álvarez R., Barragán E. y Chombo P. (2005) *Reglas de Uso. Marca colectiva: Queso Cotija Región de Origen*. México. pp. 1-15.
- 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.
- Astiasarán, I. y Martínez J.A. (1999) *Alimentos composición y propiedades*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 69-71.
- Bazán-Gómez A. (2007) Detección de albúmina 2S en aislados de ajonjolí. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*.
- Beresford T., Fitzsimons N. A., Brennan N. L. and Cogan T. (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal*. 11:259-274.
- Bernardeau M., Vernoux J. P., Henri-Dubernet S. and Guénguen M. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. *International Journal of Food Microbiology*. 126:278-285.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.
- Bravo-Mendoza A. (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 91-93.

- Cabeza-Herrera E. A. (2006). *Bacterias ácido lácticas (BAL): aplicaciones como cultivos estarter para la industria láctica y cárnica*. Simposio Regional de Microbiología “Microorganismos Eficientes en el Sector Productivo”. Universidad Libre. Barranquilla, Colombia. pp. 1-2.
- Charlier C., Even S., Gautier M. and Le Loir Y., (2008). Acidification is not involved in the early inhibition of *Staphylococcus aureus* growth by *Lactococcus lactis* in milk. *International Dairy Journal*. 18:197-203.
- Christiansen P., Nielsen E. W., Vogensen F. K., Brogren C. H. and Ardö Y. (2006). Heat resistance of *Lactobacillus paracasei* isolated from semi-hard cheese made of pasteurized milk. *International Dairy Journal*. 16:1196-1204.
- Cotter P. D., Hill C. and Ross R. P. (2005). Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*. 3:777-788.
- De Kwaadsteniet M., Todorov S., Knoetze H. and Dicks L. (2005). Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus munditii* ST15, with activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 105:433-444.
- De Vuyst L. and Vandamme E. (1994). *Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. Ed. Blackie Academic and Professional. Inglaterra. pp. 107-125.
- Delgado-Arciniega E. (En revisión). Producción de compuestos antibacterianos por bacterias ácido lácticas aisladas del queso Cotija. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 51-60.
- Delves-Broughton J. (2007). Use of Nisaplin® as a preservative in pasteurized liquid egg products. Abstract presented at The International Egg Forum 2007 Bélgica. Consultado: http://en.engormix.com/MA-poultry-industry/articles/use-nisaplin-preservative-pasteurised_822.htm.
- Eck A., (1990) *El queso*. Editorial Omega. España. pp. 3, 57-87, 237-254.

- Fox P. F., and Wallace J. M. (1997). Formation of flavor compounds in cheese. *Advances in Food Microbiology*. 45:17-85.
- Fox P., Guinee T., Cogan T. and McSweeney P. (2000) *Fundamentals of Cheese Science*. Ed. Aspen Publishers. E.U.A. pp. 17, 54-55, 237-255.
- Garde S., Ávila M., Medina M. and Nuñez M. (2005). Influence of bacteriocin-producing lactic cultura on the volatile compounds, odour and aroma of Hispánico cheese. *International Dairy Journal*. 15:1034-1043.
- Gutiérrez-Ortega A. (2008). Aislamiento y caracterización parcial de bacterias ácido lácticas halófilas de quesos en México. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 6-7.
- Hernández-Alcántara A. (2010). Caracterización de la actividad bactericida de péptidos producidos por bacterias ácido lácticas aisladas de un queso tradicional mexicano. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 51-52, 88-89.
- Hernández-Briones V. (2007). Queso Cotija: estudio del análisis fisicoquímico, proximal y actividad antioxidante. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 45-56.
- Hernández-Briones V., Quirasco-Baruch M. y Quintero-Salazar B. (2009). Un acercamiento al mundo del queso Cotija Región de Origen^{MC}: arte y tradición de México. *Culinaria. Revista Virtual Gastronómica*. 5:5-19.
- Hernández-Mejía N. (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas del queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM*. pp. 103-104.
- Hussain M. H., Rouch D. A. and Britz M. L. (2009). Biochemistry of non-starter lactic acid bacteria isolate *Lactobacillus casei* GCRL163: Production of metabolites by stationary-phase cultures. *International Dairy Journal*. 19:12-21.
- Irlinger F. and Mourier J. (2009). Microbial interactions in cheese: implications for cheese quality and safety. *Current Opinion in Biotechnology*. 20:142-148.

- Kang O.J., Laberge S. and Simard R. E. (2003). Detection and localization of a peptidoglycan hydrolase in *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus*. *American Dairy Science Association*. 86:96-104.
- King T. P. (1972). Separation of proteins by ammonium sulfate gradient solubilization. *Biochemistry*. 3:367-371.
- Lacks S. A. and Springhorn S. S. (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*. 10:7467-7473.
- Leclerc D. and Asselin A. (1989). Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing gel electrophoresis. *Canadian Journal of Microbiology*. 35:749–753.
- Marilley L. and Casey M. G. (2003). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology*.
- Michanie S. (2003). *Escherichia coli* O157:H7, la bacteria que dispara el HACCP en la industria de la carne. *Rev. Ganado y Carne*. 4(17):40-42.
- Muñoz A., Ananou S., Gálvez A., Martínez-Bueno M., Rodríguez A., Maqueda M. and Valdivia E. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* in dairy products by enterocin AS-48 produced in situ and ex situ: Bactericidal synergism with heat. *International Dairy Journal*. 17:760-769.
- Murray P., Rosenthal K. and Pfäuer M. (2006). *Microbiología médica*. Ed. Elsevier. España. pp. 3-5.
- NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Consultado 5 de julio del 2010.
- Norma Mexicana: NOM-115-SSA1-1994, Bienes y servicios. Método para la determinación de *Staphylococcus aureus* en alimentos.
- Norma Mexicana: NOM-121-SSA1-1994, Bienes y servicios. Quesos: frescos, madurados y procesados. Especificaciones sanitarias.

- Poméon T. (2007) El queso Cotija, México Un producto con marca colectiva queso “Cotija Región de origen”, en proceso de adquisición de una Denominación de Origen *CIESTAAM*, *Universidad Autónoma Chapingo* pp. 16-18.
- Prescott L. (2002). *Microbiology*. Editorial McGraw-Hill. 5ta. edición. E.U.A pp 122-123.
- Ramírez R., Luna B., Mejía A., Velázquez O., Tsuzuki G., Vierna L., Hernández L., Münggenburg I., Camacho A. y Urzúa M. (2006) *Manual de Prácticas de Microbiología General*. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 153-155.
- Rodríguez E., Calzada J., Arqués J. L., Rodríguez J. M., Nuñez M. and 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.
- Rodríguez E., González B., Gaya P., Nuñez M. and Medina M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*. 10:7-15.
- Salminen S., Von Wright A. and Ouwehand A. (2004). *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*. Editorial Marcel Dekker. 3ra edición. E.U.A. pp. 5-24, 375-387.
- Sánchez C. (2006) Queso Cotija. [http:// www.restaurantesdemexico.com.mx](http://www.restaurantesdemexico.com.mx). Visitado el 15 de agosto del 2009.
- Todorov S. D. and Dicks L. M. T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:166-172.

- Vallejo M., Etchechoury V., Horiszny C. y Marguet E. (2009). Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. *Analecta Veterinaria*. 29:15-19.
- Van den Berg G. and Exterkate F.A., (1993) Technological Parameters Involved in Cheese Ripening. *Int. Dairy Journal*. 3:485-507.
- Zúñiga-Bustos A. B. (2009) Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por método moleculares. *Tesis de Maestría. Facultad de Química. UNAM*. pp. 6-8.