



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIBACTERIANOS POR BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS
AISLADAS DEL QUESO COTIJA**

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

PRESENTA

ESTELA DELGADO ARCINIEGA



MÉXICO D.F.

2013



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.

ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN RECIBIÓ EL APOYO DE PAPIIT IN213109-2 “EL QUESO COTIJA: UNA FUENTE DE COMPUESTOS FUNCIONALES Y MICROORGANISMOS IMPORTANTES EN LA INOCUIDAD DE ALIMENTOS”.

DEDICATORIAS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *alma mater* por darme las herramientas necesarias para hacer mis sueños realidad.

A mis padres por su incondicional apoyo y encaminarme a lograr mis metas.

A mi hermano por su apoyo y amistad.

A mis tíos y primos por su cariño.

A mis amigos por hacer mi experiencia estudiantil inolvidable.

RECONOCIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado durante la realización de este proyecto a:

Dra. Maricarmen Quirasco Baruch por su amistad, apoyo y orientación durante el proyecto.

Q.A Israel García Cano por su asesoría y apoyo durante la realización del proyecto.

A los integrantes del comité tutorial por sus opiniones y consejos

A los alumnos del Laboratorio 312 por el apoyo brindado durante la realización del proyecto.

“Every great and deep difficulty bears in itself its own solution. It forces us to change our thinking in order to find it”.

Niels Bohr

“Always recognize that human individuals are ends, and do not use them as means to your end”.

Immanuel Kant

ÍNDICE

| | Página |
|--|---------------|
| I. RESUMEN | 3 |
| II. INTRODUCCIÓN | 5 |
| 1. GENERALIDADES DEL QUESO | 5 |
| 2. GENERALIDADES DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS. | 7 |
| 2.1 EJEMPLOS DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS PRESENTES EN ALIMENTOS | 9 |
| 2.2 METABOLISMO DE LAS BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS | 10 |
| 3. GENERALIDADES DE LAS BACTERIOCINAS | 13 |
| 3.1 CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIOCINAS | 15 |
| 3.2 MECANISMO DE ACCIÓN | 16 |
| III. ANTECEDENTES | 19 |
| 1. GENERALIDADES DEL QUESO COTIJA | 19 |
| 1.2 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL QUESO COTIJA | 22 |
| 1.3 COMPOSICIÓN DEL QUESO COTIJA | 23 |
| 2. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA | 24 |
| 3. COLIFORMES TOTALES | 27 |
| IV HIPÓTESIS | 30 |
| V OBJETIVOS | 31 |
| VI ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 32 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 33 |
| 1. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS | 33 |
| 2. CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO | 33 |
| 3. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 4. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA | 34 |
| 5. TRATAMIENTO DEL SOBRENADANTE | 35 |
| 6. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA | 35 |
| 7. PRUEBA PRESUNTIVA POR DIFUSIÓN EN AGAR | 35 |
| 8. PRUEBA TURBIDIMÉTRICA EN MICROPLACA | 36 |
| 9. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO SOBRE UN μOO INDICADOR | 37 |
| 10. PERFIL ELECTROFORÉTICO | 37 |
| 10.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR DEL COMPUESTO ANTIBACTERIANO | 37 |
| 11. ZIMOGRAMAS | 40 |
| VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 42 |
| 1. IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA | 42 |
| 2. CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS AISLADAS DEL QUESO COTIJA | 43 |
| 3. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA | 49 |
| 4. PRUEBA PRESUNTIVA POR DIFUSIÓN EN AGAR | 50 |
| 5. PRUEBA TURBIDIMÉTRICA EN MICROPLACA | 61 |
| 6. DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL COMPUESTO ANTIBACTERIANO SOBRE UN MICROORGANISMO INDICADOR | 73 |
| 7. PERFIL ELECTROFORÉTICO | 79 |
| 7.1 DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR EN GEL TRIS-TRICINA | 79 |
| 7.2 ZIMOGRAMAS | 80 |
| IX. CONCLUSIONES | 84 |
| X. REFERENCIAS | 86 |

I. RESUMEN

El queso Cotija es un producto lácteo artesanal que se elabora a partir de leche bronca de vacas criollas, es madurado por un periodo de 3 meses hasta 2 años y es el primer producto alimenticio procesado artesanalmente que ostenta una Marca Colectiva en México.

Entre los diferentes grupos de microorganismos que se han aislado del queso Cotija se encuentran diversas Bacterias Ácido Lácticas (BAL), quienes son responsables de la disminución del pH en el producto. Dentro de los géneros de BAL que se han aislado de este queso en particular se encuentran *Enterococcus* y *Lactobacillus*, los cuales se ha reportado que producen compuestos con actividad antibacteriana contra microorganismos de interés en inocuidad alimentaria [Muñoz-Rojas, SF]. Bravo en el 2008, reportó que el número de coliformes totales disminuye a < 3 UFC/g durante los primeros 90 días del proceso de maduración del queso Cotija, debido a cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso, como la disminución del a_w y del pH. El presente trabajo tiene como objetivo comprobar si el efecto observado en la disminución de coliformes totales, se debe además de los factores fisicoquímicos, a la presencia de BAL en el queso Cotija que pudieran ser productoras de compuestos antibacterianos.

Se realizaron cinéticas de crecimiento de nueve cepas que se habían aislado de queso Cotija "Región de Origen" de las cuales, seis corresponden al género *Enterococcus* y tres al género *Lactobacillus*. Se observó que en las pruebas presuntivas por difusión en agar, las cepas que tuvieron mayor actividad antibacteriana extracelular fueron del género *Lactobacillus* (*paracasei*, *brevis* y *pentosus*) y una cepa del género *Enterococcus* (*faecalis*). Estos resultados se corroboraron mediante la técnica turbidimétrica en microplaca en donde la cepa *L. pentosus* fue la que tuvo mayor actividad contra *S. aureus* mientras que la cepa *E. faecalis* fue la que presentó mayor actividad contra *E. coli*. Se determinó que las cepas tuvieron mayor actividad antibacteriana cuando se encontraban en la fase estacionaria temprana de crecimiento. Posteriormente se realizaron ensayos para determinar si el efecto era bactericida. De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere

que el efecto del sobrenadante crudo las cepas analizadas es bacteriostático, ya que se observó una disminución en la velocidad de crecimiento de los microorganismos indicadores y no su muerte.

Se determinó el perfil electroforético del sobrenadante de las cepas que presentaron la mayor actividad antibacteriana. Se observó que las cepas analizadas (*L. paracasei*, *L. brevis*, *L. pentosus* y *E. faecalis*) presentan proteínas de bajo peso molecular entre 27 y 3.5 kDa. Se corroboró la actividad antibacteriana de los péptidos de los sobrenadantes de las 4 cepas en estudio mediante zimogramas y se comprobó que la actividad antibacteriana está dada por los péptidos de bajo peso molecular presentes en los sobrenadantes de las BAL analizadas.

II.INTRODUCCIÓN

1. Generalidades del Queso

El queso se define como la concentración de los sólidos de la leche, que se obtienen por el fenómeno de coagulación de las caseínas de la misma, y por la acidificación y deshidratación de la cuajada [Hernández, 2007]. Las modificaciones realizadas durante el proceso de elaboración dan lugar a una amplia variedad de quesos que se ajustan al gusto del consumidor [García, 2007].

El proceso de elaboración de un queso se basa en cinco operaciones fundamentales comunes: 1) preparación o estandarización de la leche, 2) adición de microorganismos iniciadores, 3) coagulación, 4) desuerado y 5) salado y maduración [García *et al*; 2004].

En el mundo existen aproximadamente 1000 variedades de quesos que comparten diversos pasos en su elaboración. Las diferencias de textura, aroma, sabor, color, se deben fundamentalmente a factores como: a) tipo de leche: vaca, oveja, cabra, b) calidad de la leche: pasteurizada, cruda, pasteurizada, c) relación de concentraciones proteínas-grasa; d) tipos de microorganismos y enzimas adicionadas, e) velocidad e intensidad del desarrollo de la acidez; f) tipo y concentración de la enzima coagulante; g) grado y forma de deshidratación del coágulo; h) cantidad y forma de adición de la sal; i) forma y tamaño del queso; j) condiciones de maduración, temperatura, humedad, etcétera [Badui, 2006].

De acuerdo a la NOM -121-SSA1-1994 los quesos se clasifican de acuerdo a su proceso en:

*Fresco (frescales, de pasta cocida y acidificados)

*Maduros (prensados, prensados de pasta dura y de maduración con mohos)

*Procesados (fundidos y fundidos para untar)

La conversión de leche a queso ha sido probablemente la manera más efectiva de almacenamiento de la leche de forma sólida, los cambios físicos, químicos y microbiológicos juegan un parte importante en el proceso de formación del queso [Robinson, 1990].

El queso constituye una fuente concentrada de proteínas (caseína principalmente), que contiene todos los aminoácidos esenciales (Ile, Leu, Lys, Tre, Trp, Phe y Val) y nitrógeno inorgánico que compensa la ligera deficiencia de aminoácidos sulfurados (Met y Cys) de la caseína [García, 2007].

El queso también es una fuente importante de vitaminas, ácidos grasos esenciales y aporte energético, que varía dependiendo de la concentración de grasa que se encuentre en la leche utilizada como materia prima. Generalmente en la leche de vaca el 2% total de los ácidos grasos corresponden a ácidos grasos poliinsaturados y el 70% a ácidos grasos insaturados.

La calidad de un queso está determinada por su aroma, sus propiedades reológicas y su apariencia, la primera de estas características es la más importante [Cayot, 2007]. Los compuestos de bajo peso molecular que se forman durante la fabricación del queso, y en reacciones secundarias durante la maduración de este alimento, son los que contribuyen significativamente al sabor y olor del queso. Se han identificado cerca de 600 compuestos volátiles en diversas variedades de quesos y muchos de ellos han sido relacionados con las notas particulares de olor y aroma que los lácteos poseen [Curioni & Bosset, 2002].

Durante la elaboración y maduración del queso ocurren interacciones complejas entre las distintas poblaciones microbianas presentes. Los factores fisicoquímicos del queso también promueven estas interacciones. La elucidación de las mismas contribuye al conocimiento y entendimiento del proceso de maduración del queso [Beresford *et. al*, 2001].

En la etapa de maduración del queso ciertas reacciones bioquímicas rigen la formación del aroma. Componentes de sabor y olor son producidos a partir de los tres componentes mayoritarios en la leche: lactosa, lípidos y proteínas [McSweeney & Sousa, 2000].

La lipólisis de los triglicéridos de la leche da como resultado una gran concentración de ácidos grasos de cadena media y corta, que tienen un enorme impacto en el desarrollo del aroma de los quesos. Los ácidos grasos reaccionan con alcoholes para formar ésteres,

como el etil butanoato, etil acetato, entre otros; también pueden sufrir reacciones de descarboxilación y β -oxidación para dar lugar a alcoholes secundarios, metil cetonas y lactonas [Cogan *et al.*, 1993].

La proteólisis contribuye directamente al desarrollo del aroma ya que hay formación de péptidos y aminoácidos. Estos últimos son sustratos de reacciones como transaminación, deshidrogenación, descarboxilación y reducción, produciendo una variedad de compuestos como aldehídos, ácidos y tioles [Cogan *et al.*, 1993].

2. Generalidades de las Bacterias Ácido Lácticas

Los microorganismos son un componente esencial de todas las variedades naturales de queso y juegan un papel muy importante durante su elaboración y maduración. Las bacterias ácido lácticas (BAL) son los principales microorganismos que participan en la elaboración del queso [Beresford, *et. al*, 2001]. Se describen como bacterias Gram positivas, no móviles, no esporuladas, no pigmentadas, catalasa, reductasa y oxidadaasa negativas y no reducen nitratos, pueden ser cocos o bacilos y se caracterizan por producir ácido láctico [Salminen *et Wright*, 1998; Fox *et. al*, 2000,].

Las BAL se clasifican en los géneros *Aerococcus*, *Alloicococcus*, *Carnobacterium*, *Dolosigranulum*, *Enterococcus*, *Globicatella*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Lactosphaera*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weisella*; el género *Bifidobacterium* se ha considerado como una bacteria ácido láctica y comparte algunas de las características típicas, sin embargo no está relacionado filogenéticamente [Salminen *et Wright*, 1998].

La producción de alimentos fermentados se basa en el uso de cultivos iniciadores tales como las BAL. Una de las funciones que desempeña la fermentación de los alimentos, como lo es la elaboración del queso mediante la fermentación de la leche, es lograr su conservación. En una gran variedad de quesos las BAL contribuyen con las características sensoriales en el queso, ya sea cuando están en su fase logarítmica o cuando ocurre la lisis celular ya que liberan a la matriz del queso enzimas como proteasas, peptidasas, esterases

y compuestos que catabolizan aminoácidos contribuyendo así, con la producción de compuestos aromáticos [Pelaéz & Requena, 2005]. Además de las características sensoriales que proporcionan al alimento, son productoras de compuestos antibacterianos, edulcolorantes, vitaminas y enzimas con propiedades probióticas [De Vuyst, 2004].

El uso de microorganismos como cultivos iniciadores en los alimentos busca principalmente 3 objetivos, el más importante es la preservación del alimento. El segundo objetivo es indicar algún abuso en el producto, especialmente el abuso en la temperatura de productos refrigerados. El tercer objetivo se basa en el control del crecimiento de microorganismos patógenos en alimentos semiconservados y refrigerados [Bibek, 1992]. La actividad antibacteriana dada por las BAL es una alternativa para combatir contaminación antimicrobiana en un sistema alimenticio [Holzapfel and Stiles, 1997].

Las BAL son cocos o bacilos gram positivos que producen ácido láctico a partir de la fermentación de los azúcares, pueden crecer tanto en presencia como en ausencia de oxígeno por lo cual, son consideradas como anaerobias aerotolerantes. Dependiendo de la materia prima en la que se encuentran la BAL así como el género y especie al que correspondan, las bacterias ácido lácticas pueden producir compuestos antibacterianos que incluyen ácidos orgánicos (láctico, acético, propiónico), alcoholes, diacetilo, reuterina, H₂O₂, bacteriocinas y otros metabolitos indefinidos [Daeschel, 1989].

Daly *et al*; [1972] reportó una serie de bacterias ácido lácticas capaces de inhibir ciertos microorganismos patógenos. En la Tabla 1 se observan algunos de los microorganismos patógenos inhibidos por BAL.

Tabla 1. Inhibición del crecimiento de microorganismo patógenos por Bacterias ácido lácticas (adaptado de Bibek, 1992).

| Bacteria ácido láctica | Microorganismo patógeno | Porcentaje de inhibición |
|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------|
| <i>Lactobacillus L-3</i> | <i>Pseudomonas PIII</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus diacetylactis</i> | <i>Pseudomonas spp</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus diacetylactis</i> | <i>Salmonella spp</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus diacetylactis</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus diacetylactis</i> | <i>Clostridium perfringens</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus diacetylactis</i> | <i>Vibrio parahaemolyticus</i> | 99 % a las 24 h |
| <i>Streptococcus lactis</i> | <i>Listeria monocytogenes</i> | 99 % en 3 h |
| <i>Lactobacillus acidophilus</i> | <i>Salmonella thyphimurium</i> | 87 % en 6 h |

2.1 Ejemplos de bacterias ácido lácticas en alimentos

Los géneros más importantes de las bacterias ácido lácticas que se han encontrado en productos de elaboración artesanal son *Lactobacillus* y *Enterococcus* [Beresford *et al*, 2001].

Las bacterias del género *Lactobacillus* poseen, como su nombre lo indica, una morfología bacilar variando de longitud y de grosor. La mayoría poseen un metabolismo homofermentativo, aunque algunos son heterofermentativos y son muy comunes en todo tipo de derivados lácteos. Los *Lactobacillus* son generalmente más resistentes a las condiciones ácidas que otras bacterias lácticas y son capaces de crecer a pH de 4.

Se aíslan fácilmente de una gran cantidad de hábitats, por selección directa de medios que contengan azúcares y ácidos. Su resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya descendido tanto, que otras bacterias lácticas ya no puedan crecer [Madigan *et al*; 2004].

Las bacterias del género *Enterococcus* son clasificados como cocos gram positivos, catalasa negativos, forman parte de la microbiota intestinal de muchos animales,

incluyendo a los seres humanos y juegan un papel importante en mantener el balance microbiológico [Madigan *et al.*, 2004]. El género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, entre las que *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las más difundidas especialmente en los alimentos y ambientes relacionados [Giraffa, 2003].

En la Tabla 2 se muestran ejemplo de alimentos fermentados y sus respectivas bacterias ácido lácticas relacionadas.

Tabla 2. Ejemplos de productos fermentados y sus respectivas BAL (adaptado de De Vuyst, 2004)

| Producto Fermentado | *Bacterias ácido lácticas |
|------------------------------|--|
| Quesos tipo italiano y suizo | <i>Lb. delbrueckii subsp. lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> |
| Mantequilla | <i>L. lactis subsp. lactis</i> , <i>L. lactis subsp. lactis var. diacetyllactis</i> , <i>L. lactis subsp. cremoris</i> , <i>Leuc. mesenteroides subsp.</i> |
| Yogurt | <i>Lb. delbrueckii subsp. bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i> |
| Leche fermentada probiótica | <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i> <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i> |
| Col agria (sauerkraut) | <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> |
| Aceitunas fermentadas | <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i> |
| Salsa de soya | <i>T. halophilus</i> |
| Vino de arroz | <i>Lb. sakei</i> |

*B.=Bifidobacterium, C.=Carnobacterium, L.=Lactococcus, Lb.=Lactobacillus, Leuc.=Leuconostoc, O.=Oenococcus, P.=Pediococcus, S.=Streptococcus, T.=Tetragenococcus

2.3 Metabolismo de las bacterias ácido lácticas.

El metabolismo de azúcares de las BAL se lleva a cabo por dos vías diferentes y se dividen en dos grupos: homolácticas y heterolácticas. La mayoría de las BAL obtienen su energía solamente del metabolismo de los azúcares y tienen un metabolismo biosintético bastante limitado por lo que requieren medios de cultivo ricos en aminoácidos, vitaminas,

purinas y pirimidinas. La glucólisis (Vía de Embden Meyerhof-Prans) resulta casi exclusivamente en la producción de ácido láctico como producto final y es nombrada como fermentación homoláctica u homofermentativa [Marilley and Casey, 2004]. Especies de *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* así como *Lactobacillus*, metabolizan hexosas mediante la vía de Embden Meyerhof- Prans (Figura 1). La lactosa presente en la leche, materia prima para la elaboración de quesos, es hidrolizada a glucosa y galactosa, estos azúcares son después transformados a piruvato por la vía Embden-Meyerhof, según el tipo de metabolismo que posean.

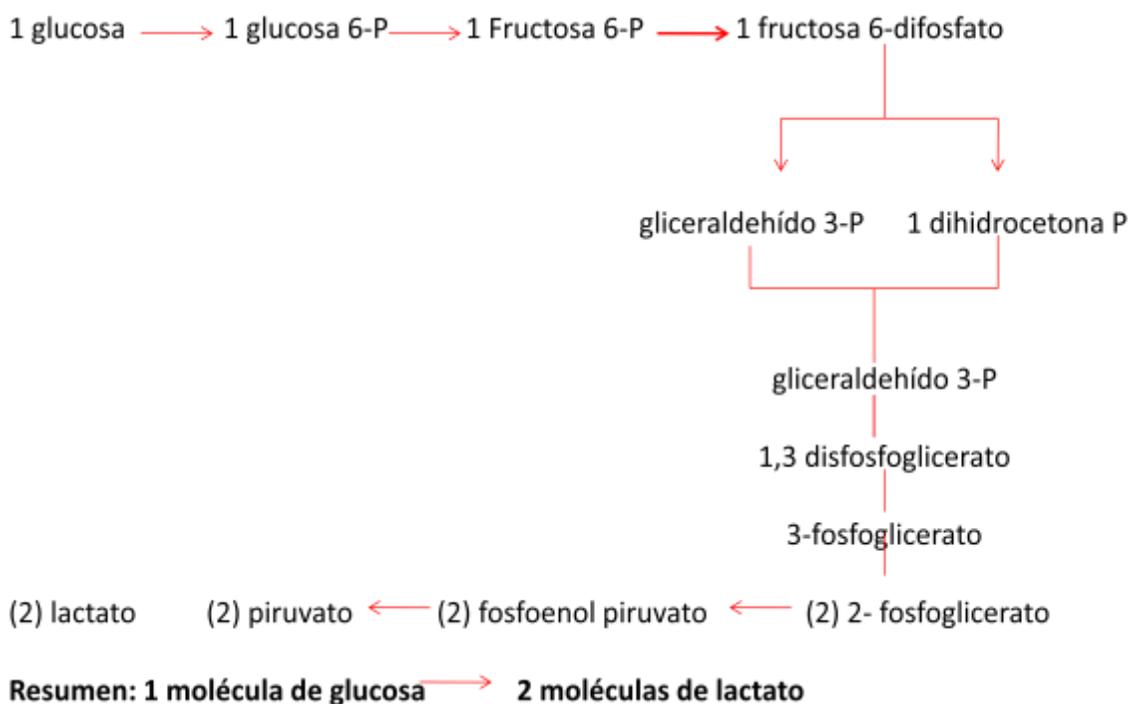


Figura 1. Metabolismo de hexosas por bacterias ácido lácticas homofermentativas mediante la ruta de Embden Meyerhof- Prans (Tomado y modificado de Bibek, 1992)

Este tipo de bacterias han sido esenciales en los procesos de fermentación de muchos alimentos y contribuyen significativamente en el aroma, sabor, textura y en muchos casos en el valor nutricional de diversos productos.

El piruvato es la materia prima para formación de compuestos de cadena corta que aportan olor y sabor, como diacetilo, acetoína, acetato, acetaldehído y etanol. El citrato es metabolizado para producir acetolactato, diacetilo y acetoína [Cogan *et al.*, 1993].

Además de ácido láctico como producto de la fermentación, las BAL producen ácidos orgánicos como ácido acético, ácido fórmico, ácido caproico y compuestos como etanol, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y bacteriocinas; el ácido acético por ejemplo, contribuye en el aroma y previene la contaminación por mohos en levadura [Leroy and De Vuyst, 2004]. La producción de estos ácidos orgánicos depende del género de BAL así como el pH del medio en el que éstas se encuentran. Para el caso del ácido láctico, acético y propiónico, su efectividad antibacteriana mejora considerablemente en alimentos con un pH menor a 5 [Konings and Otto, 1983, Sneath, 1986]. En la Tabla 3 se observa el porcentaje de producción de ácidos orgánicos por diferentes BAL.

Tabla 3. Producción de ácidos orgánicos por diferentes géneros de BAL (Tomado de Bibek, 1992)

| Género | % Ácido producido | pH |
|--------------------------|--------------------------|-----------|
| <i>Lactococcus</i> | 0.8 | 4.5 |
| <i>Streptococcus</i> | 1.0 | 4.0 |
| <i>Leuconostoc</i> | 0.6 | 4.8 |
| <i>Pediococcus</i> | 1.5 | 3.5 |
| <i>Lactobacillus</i> | 1.5 | 3.5 |
| <i>Bifidobacterium</i> | 1.0 | 4.0 |
| <i>Propionibacterium</i> | 1.0 | 5.0 |

3. Generalidades de las bacteriocinas

Para asegurar su existencia o la prevalencia en un nicho ecológico, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa contra competidores. [Topisirovic *et al*, 2006]. Tal es el caso de la producción de péptidos antibacterianos.

Las bacteriocinas se definen como péptidos que son activos contra bacterias estrechamente relacionadas con la cepa productora [Cotter *et al*; 2005].

Las bacteriocinas provenientes de BAL son de bajo peso molecular y se pueden utilizar como conservadores [Cleveland *et al*; 2001]. Por ejemplo, bacteriocinas producidas por BAL pueden ser usadas en vez de nitrato de potasio y evitar la contaminación de quesos por bacterias del género *Clostridium* [Matargas *et al*; 2003].

Las bacteriocinas producidas por BAL pueden ser de amplio o corto espectro pero en general, son activas contra bacterias Gram positivas. Se ha encontrado actividad contra bacterias Gram negativas, cuando la membrana celular se ve comprometida [Cotter *et al*; 2005].

Las bacteriocinas fueron caracterizadas por primera vez en bacterias Gram negativas, pero también pueden ser encontradas en bacterias Gram positivas (Riley & Wertz, 2002). Al ser heterogéneas, difieren en sus espectros de actividad, características bioquímicas y genéticas pero comparten características similares tales como su tamaño, ya que la mayor parte de estos compuestos son pequeños (3 a 30 kDa), tienen un punto isoeléctrico elevado y contienen una proporción similar de dominios tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Los genes que las codifican están usualmente asociados a un plásmido o en su defecto, son cromosomales [Doyle *et al*; 2000].

Las bacteriocinas se forman a partir de precursores llamados pre-péptidos, que aparentemente no tienen actividad biológica y contienen una secuencia líder en el extremo N-terminal. Mediante una proteólisis específica el pre-péptido separa la secuencia líder del resto de la molécula y de manera simultánea es transportado fuera de la célula. La remoción de la secuencia líder durante la translocación transmembranal es

completada por la misma proteína que está asociada con el transporte de la bacteriocina. Una característica importante de la mayoría de estas secuencias líderes es la presencia de dos residuos de glicina en el carboxilo terminal, pero no es una característica determinante. Se cree que dichas secuencias sirven como una señal para la síntesis y secreción de las bacteriocinas.

Como ya se mencionó estos compuestos poseen un espectro algo estrecho de acción que además puede verse afectado por factores tales como la concentración de la bacteriocina, el tiempo de acción contra el microorganismo blanco, la relación de la concentración de célula blanco con la de la célula productora, el medio de cultivo, la cantidad de lípidos presentes en la membrana de la célula que está siendo atacada, el pH, entre otros [Todorov & Dicks, 2006; Delgado *et al.*, 2007]. También se ha observado que los microorganismos pueden crear una resistencia natural a los péptidos si son expuestos a ellos [Rekhif *et al.*, 1994].

Varias especies de microorganismos iniciadores han sido reportados como productores de metabolitos antibacterianos tales como *Lactococcus lactis* [Gherna and Plenta, 1989], *Lactobacillus casei* [Rammelsberg *et al.*; 1990], *Lactobacillus brevis* [Rammelsberg *et al.*; 1990] así como *Enterococcus faecium* [Ahn and Stiles, 1990].

Una gran cantidad de bacteriocinas han sido aisladas de carne y productos lácteos (Tabla 4). La incorporación de bacteriocinas como un ingrediente bioconservador en matrices alimentarias ha sido estudiada extensivamente y se ha demostrado su efectividad en el control de microorganismos de interés sanitario, como *Listeria monocytogenes* [Vlaemyneck *et al.*; 1994], *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [Rodríguez *et al.*, 2005]; Las Bacteriocinas son consideradas como GRAS (Generally Recognized As Safe) por la FDA [Food Drug Administration]. Sólo tres bacteriocinas, Nisina [Hurst, 1981; Fowler *et al.*; 1983] de *Lactococcus lactis*, Pediocina Ach [Motlagh, 1991] de *Pediococcus acidilactici* H y Pediocina PA1 [Rozbeh, 1990] de *Pediococcus acidilactici* PAC 1 han sido empleadas en diferentes sistemas alimenticios teniendo un efecto bactericida contra microorganismo patógenos.

Tabla 4. Ejemplos de cepas productoras de bacteriocinas aisladas de productos alimenticios.
(Adaptada de Cleveland et al, 2001)

| Fuente | Cepa | Microorganismo blanco |
|----------------------------|------------------------------------|--|
| Productos con probióticos | <i>Streptococcus sp</i> CNCM I-841 | <i>Clostridium sp</i> , <i>L. monocytogenes</i> |
| Queso amarillo de Bulgaria | <i>Lactob. delbruekii sp</i> | <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E.coli</i> |
| Queso Monster | <i>Lactob. plantarum</i> WHE92 | <i>L. monocytogenes</i> |
| Queso tradicional francés | <i>Enterococcus faecalis</i> | <i>L. innocua</i> |
| Salchichas secas | <i>Lactobacillus plantarum</i> UG1 | <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Clostridium sp.</i> |
| Granos de kefir irlandés | <i>Lactococcus lactis</i> DPC3147 | <i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i> |
| Queso Holandés | <i>Brevibacterium lines</i> M18 | <i>Listeria</i> , <i>Corinobacterium spp</i> |

3.1. Clasificación de las bacteriocinas.

Las bacteriocinas se clasifican de acuerdo a su mecanismo de acción así como su estructura básica y se clasifican en dos tipos:

CLASE I: Poseen el aminoácido lantionina y tienen un doble mecanismo de acción, esto es, se unen a la molécula lípido II, principal transportador de las unidades de peptidoglucano del citoplasma hacia la pared celular evitando así la correcta síntesis de la pared celular; y también, pueden utilizar la molécula lípido II para introducirse de forma directa a la membrana celular y formar poros [Cotter *et al*; 2005]. Inhiben el proceso de biosíntesis de macromoléculas como ADN, ARN, proteínas y polisacáridos.

Un ejemplo de este tipo de bacteriocinas es la nisina (Figura 2), que es producida por cepas de *Lactococcus lactis*, su uso como conservador está aprobado en casi 50 países para la industria alimentaria.

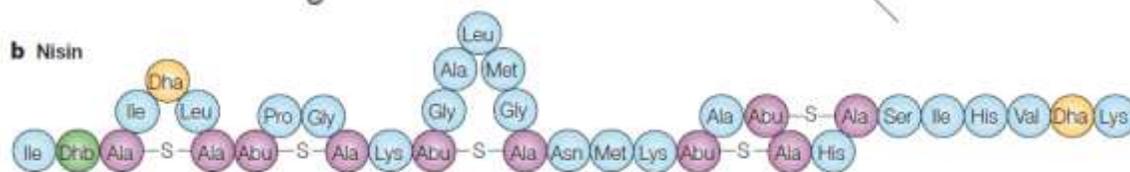


Figura 2. Estructura de la nisina.
Tomado de Cotter et al (2005)

CLASE II: No poseen el aminoácido lantionina; tienen una estructura helicoidal y anfifílica, la cual permite introducirse a la membrana celular y provocar su despolarización. Un tratamiento con este tipo de péptidos (Tabla 5) provoca la salida de iones K^+ . También se ha demostrado que pueden disipar el potencial electroquímico de la membrana e inducir a la liberación de aminoácidos y otros compuestos de bajo peso molecular [Ennahar *et al*; 2000; Hécharrd and Sahl, 2002;].

3.2. Mecanismo de acción

Las bacteriocinas (Tabla 5) alteran la integridad de la membrana celular del microorganismo objetivo incrementando así su permeabilidad a compuestos de tamaño pequeño. La adición de dichos péptidos a células vegetativas conlleva a una salida rápida e inespecífica de iones, aminoácidos y en algunos casos, moléculas de ATP acumuladas. Este flujo incrementado a través de la membrana disipa rápidamente el gradiente químico y eléctrico a través de la misma. La fuerza motriz de los protones (PMF), un gradiente electroquímico que sirve como principal fuerza conductora de muchos procesos vitales dependientes de energía, se disipa a los pocos minutos de la adición de las bacteriocinas. Se sabe que el componente de gradiente químico (ΔpH) de la PMF se disipa con mayor rapidez que el componente de gradiente eléctrico ($\Delta \Psi$), probablemente como resultado de la rápida entrada de protones al citoplasma [Hécharrd and Sahl, 2002] (Figura 3).

Entre las fuentes más comunes que existen para el aislamiento de cepas productoras de bacteriocinas están los productos tradicionales [Saavedra *et al*, 2003], es decir, aquéllos que sufren un proceso fermentativo natural sin la necesidad de adicionar cultivos iniciadores. En México se cuenta con una gran diversidad de alimentos fermentados de manera natural, un ejemplo típico es el queso Cotija.

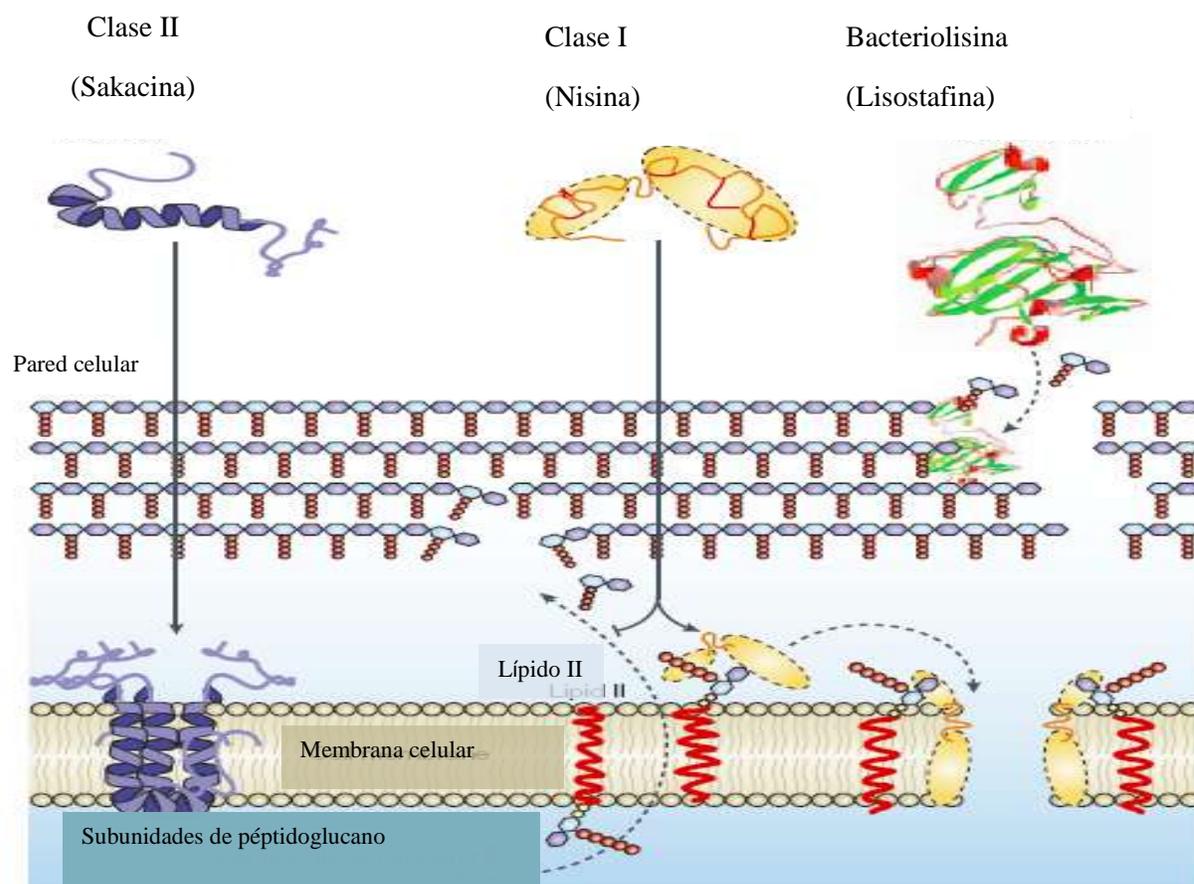


Figura 3. Mecanismo de acción de las bacteriocinas
Tomado y modificado de Cotter et al; (2005)

Tabla 5. Mecanismo de acción de algunas bacteriocinas de Clase II. (Modificada de Hécharrd, 2002)

| Bacteriocina | Modo de acción | ΔpH | $\Delta \Psi$ | ATP | Compuestos liberados |
|--------------------|---|-------------|---------------|--------------------------|----------------------|
| Enterocina P | Poros K^+ | Sin efecto | Disipación | Disminución intracelular | K^+ , CF |
| Mesenteicina Y 105 | Formación de poros de modo específica | ND | Disipación | ND | Aminoácidos |
| Pediocina PA-1 | Formación de poros | Disipación | Disipación | Disminución intracelular | Aminoácidos, K^+ |
| Lactococcina G | Formación de poros específica (catiónica) | Sin efecto | Disipación | Disminución intracelular | Aminoácidos |
| Plantaricina EF | Formación de poros específica (catiónica) | Disipación | Disipación | ND | Cationes |
| Plantaricina JK | Formación de poros específica (aniónica) | Disipación | Disipación | ND | Aniones |
| Lactococcina 972 | Inhibición de células sólo en fase estacionaria | ND | ND | ND | No hay flujo |
| Plantaricina A | Formación de poros | Disipación | Disipación | ND | ND |

ND No Determinado; CF carboxifluoresceína (provoca acción lisosomal)

III. ANTECEDENTES

1. Generalidades del queso Cotija

El queso Cotija es un derivado lácteo que se elabora artesanalmente en México, a partir de leche bronca de vaca como materia prima. El queso Cotija (Figura 4) se clasifica como un queso madurado, de pasta dura y de gran formato con un peso que oscila de los 20-30 kg, posee una pasta friable (desmoronable), ácida y con un porcentaje elevado de sal (aprox. 6%); cuando está maduro, presenta un color blanco amarillento agradable y un sabor-aroma bastante pronunciado [Villegas, 2004].

El queso Cotija es madurado durante un tiempo variable de 3 meses a varios años y se considera que el producto genuino debe ser madurado al menos 100 días.



Figura 4. Queso Cotija

El queso Cotija es un queso con enorme tradición mexicana, se conoce su existencia desde hace 400 años. Es originario de la región aledaña a Cotija de la Paz en el estado de Michoacán y actualmente, el producto auténtico sólo es elaborado por un reducido grupo de habitantes de las inmediaciones serranas de los estados de Jalisco y Michoacán, la sierra de JalMich (Figura 5), en jurisdicción de los municipios de Santa María del Oro y Jilotlán en Jalisco, así como Tocombo y Cotija en Michoacán [ARPQC, 2005].



Figura 5. Sierra de Jalmich. Región de origen del queso Cotija. (Barajas et al; 2005)

La Asociación Regional de Productores de Queso Cotija (ARPQC) busca preservar y normalizar su producción y comercialización, para proteger su tradición y evitar la competencia de imitaciones, así como mejorar sus prácticas de manufactura e higiene. Se ha publicado un manual de Reglas de Uso, en donde se describen sus particularidades, propiedades y características de elaboración [Barajas et al; 2005].

Es un producto artesanal que se obtiene mediante la fermentación con los microorganismos naturalmente presentes en la leche, y en su elaboración confluyen factores climatológicos y de medio ambiente. Considerado como un queso seco que concentra muy bien su sabor salado, es muy apreciado en México. Además, en noviembre del 2006 ganó el premio Queso Extranjero del Año en el último Festival Internacional de Quesos en Cremona, Italia sobre más de 500 participantes de todo el mundo.

Éste es uno de los pocos quesos mexicanos de sabor y olor fuertes. La función principal de este queso dentro de la comida mexicana es la de ser desmenuzado y servir de aliño y salación para muchos platillos diferentes.

Aunque la elaboración del queso es tradicional, los miembros de la Asociación Regional de Productores de Queso Cotija mantienen lineamientos de higiene y buenas prácticas durante la ordeña, fabricación y maduración del lácteo (Figura 6). Se presta especial interés en la salud de las vacas, la inocuidad de la materia prima, la limpieza de todo el material utilizado y en el aseo y salud de las personas que intervienen en todo el proceso.



Figura 6. Elaboración del queso Cotija

La producción del queso Cotija sólo se realiza durante los meses de junio a noviembre. Durante este tiempo las vacas productoras de la leche destinada a la elaboración del lácteo se alimentan bajo el régimen de libre pastoreo y no consumen alimentos balanceados o concentrados. También se verifica que los rumiantes se encuentren libres de enfermedades tales como brucelosis o tuberculosis [Barajas *et al*, 2005].

La leche utilizada cumple con las siguientes características: un contenido de sólidos grasos no menor a 3.7% y un contenido proteínico mayor o igual a 3%, así como estar exenta de residuos de antibióticos, hormonas, desparasitantes, neutralizantes y otros compuestos químicos [Barajas *et al*, 2005].

En el queso Cotija no se adiciona un cultivo iniciador sin embargo la ausencia de un tratamiento térmico en el proceso, da pauta a la participación de la microbiota propia de la leche, la sal de mar y del ambiente propio de la ordeña, elaboración y maduración [Bravo, 2008].

Para la fabricación de queso Cotija se utiliza sal de grano que está libre de materia extraña y compuestos indeseables. El cuajo usado proviene de rumiantes jóvenes, o en su caso, comercial y nunca de origen microbiano.

1.2 Proceso de elaboración

El proceso de obtención de este alimento es el siguiente:

a) Ordeña de las vacas.

Las vacas productoras de la leche deberán ser de raza cebú, criollas o híbridas (cruza de diversas razas), siempre y cuando la calidad específica de la leche para la producción del queso Cotija mantenga un mínimo de 3.7% de grasa y 3.0% de proteína. La cantidad de sólidos grasos de la leche utilizada no deberá ser menor a 3.7 % o 37 g/L.

b) Filtrado de la leche recién ordeñada, para eliminar cualquier materia extraña.

c) Reposo de la leche en recipiente limpios hasta que tenga la temperatura adecuada para la adición del cuajo. La leche se deja reposar en un recipiente de acero inoxidable limpio.

d) Adición del cuajo con agitación rápida.

Una vez que la leche alcanza la temperatura óptima para ser cuajada, se le incorpora el cuajo mezclando rápidamente, con la adición de una parte de la sal total añadida según la costumbre.

e) Reposo de la cuajada hasta que posea la consistencia adecuada.

La consistencia de la cuajada se prueba cruzando con una cuchara y una vez alcanzado el punto deseado se corta.

f) Corte de la cuajada en grumos del tamaño de granos de maíz.

g) Reposos de la cuajada troceada hasta que se asiente en el fondo del recipiente.

Es posible ayudarlo a bajar o "asentar" de manera manual ejerciendo sobre ella presión descendente con una cuchara de acero inoxidable.

h) Drenado del suero y amasado con adición de la sal.

La cuajada se separa del suelo y se deja escurrir en una artesa que puede ser de madera apropiada o acero inoxidable.

- i) Moldeado de la pasta en recipientes cilíndricos cubiertos con bandas de fibra de maguey, las piezas serán de aproximadamente 20 kilogramos.
- j) Prensado de la pasta entre 18 y 24 h, una vez transcurrido este tiempo la pieza se voltea sobre su propia cara.
- k) Desmolde del queso después de 15 días o cuando se adquiera la firmeza adecuada.
- l) Maduración y limpieza de las caras del queso por un periodo mínimo de tres meses.

1.3. Composición del queso Cotija

Dentro del grupo de trabajo del laboratorio se realizó el análisis proximal [Hernández, V. 2007] de varias piezas de queso Cotija auténtico, con el fin de conocer mejor su composición y propiedades fisicoquímicas (Tabla 6)

Tabla 6. Composición proximal (% promedio) de las muestras analizadas de queso Cotija. Tomado de Hernández, 2007

| Componente | Base Húmeda | Base Seca |
|-----------------|-------------|-----------|
| Humedad | 32-40 | --- |
| Sólidos totales | 60-68 | ---- |
| Proteína total | Mínimo 27 | Mínimo 39 |
| Grasa butírica | Mínimo 24 | Mínimo 37 |
| Minerales | 5.8-7.2 | 8.7-11.2 |
| NaCl | 2.6-4.0 | 4.7-7.4 |
| *Carbohidratos | 0.08-0.15 | 0.12-0.24 |
| **HSMG | 42.1-52.6 | -- |

* Determinados por el método fenol sulfúrico

**Humedad sin materia grasa

Una vez obtenido el producto terminado, éste debe de tener las siguientes características:

- Humedad máxima 36%
- Grasa mínima 23%

- Proteína mínima 25%
- Diámetro promedio de 40 centímetros
- Altura promedio de 18 centímetros

Para que el queso Cotija cumpla con las especificaciones que establecen las reglas de uso de la Marca Colectiva Región de Origen, éste deberá producirse de manera natural, es decir, a partir de leche entera, sin la adición de compuestos químicos o análogos de la leche u otros ingredientes que no sean sal y cuajo.

Podrá ser clasificado:

- Por su añejamiento:

Añejo. Cuando el queso tenga entre tres y seis meses de vida, la vida del queso comienza cuando es desmoldado.

Rendido. Cuando el queso tenga más de seis meses de vida.

- Por su consistencia y característica al corte:

De tajo: aquel queso que al ser cortado no se desmorona. Posee un menor contenido de sal y su porcentaje de grasa es mayor sobre el total de materia seca.

De grano: al ser cortado se desmorona, debido a que posee un menor contenido de humedad.

2. Bacterias Ácido Lácticas (BAL) aisladas del queso Cotija

Durante la manufactura de los quesos, el inicio de la fermentación comienza con la adición del cultivo indicador en la leche; sin embargo si se trata de un queso artesanal la microbiota natural la encargada de llevar a cabo dicho proceso [Marilley *et al.*, 2004]. Algunas especies de lactobacilos heterofermentativos facultativos se encuentran regularmente en la leche en bajas concentraciones, pero en algunos casos, como los quesos suizos se pueden encontrar hasta en cantidades de 10^8 UFC/g [Weinritcher *et al.*, 2001].

Dos de los géneros más importantes dentro del grupo de las lácticas que se han encontrado en productos de elaboración artesanal están *Lactobacillus* y *Enterococcus* (Beresford *et al.*, 2000), por ejemplo, la leche fermentada tradicional de la comunidad Massai en Kenia es el “Kule naoto” y de este producto se aislaron BAL para ser caracterizadas fenotípicamente por su capacidad de fermentar diferentes tipos de carbohidratos junto con otras pruebas bioquímicas. La microbiota predominante en las muestras estudiadas perteneció al género *Lactobacillus* seguido por *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Leuconostc* [Maina *et al*; 2004].

Se sabe que las BAL en particular los lactobacilos, juegan un papel importante en la preservación de los alimentos. Su habilidad para producir bacteriocinas y disminuir el pH, previene el crecimiento de patógenos [Fontana and Coconcelli, 2005]. Su resistencia al pH les permite seguir creciendo durante las fermentaciones lácticas naturales, aun cuando el pH haya descendido tanto, que otras bacterias lácticas ya no puedan crecer [Madigan *et al.*, 2004].

Tabla 7. Bacteriocinas producidas por *Enterococcus* spp. (Adaptada de De Kwaadsteniet *et al*; 2005)

| Bacteriocina | Producido por | Aislado de |
|------------------|-------------------------|-----------------------------|
| Enterocina A y B | <i>E. faecium</i> P21 | Chorizo |
| Enterocina E197 | <i>E. faecalis</i> S-47 | Chorizo |
| Enterocina CRL35 | <i>E. faecium</i> A200 | Queso |
| Enterocina P | <i>E. faecium</i> P13 | Embutidos fermentados secos |

Las bacterias del género *Enterococcus* o enterococos son clasificados como cocos gram positivos, catalasa negativos, forman parte de la microbiota intestinal de muchos animales, incluyendo a los seres humanos, y juegan un papel importante en mantener el

balance microbiológico [Madigan *et al.*, 2004]. El género *Enterococcus* incluye más de 20 especies, entre las que *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium* son las más difundidas especialmente en los alimentos y ambientes relacionados [Giraffa, 2003]. De estas dos especies se han aislado e identificado diversas enterocinas (Tabla 7). Bravo en el 2008 reportó que dentro de las cepas aisladas del queso Cotija se encontraban las cepas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* entre otros (Tabla 8). De las seis cepas del género *Enterococcus* ya han sido identificadas por métodos moleculares con la secuenciación de la región V3 del gen ADNr 16S [Zúñiga, 2009].

Tabla 8. Cepas aisladas del queso Cotija

| CEPA |
|-----------------------------|
| (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>Lactobacillus sp</i> |
| (G) <i>E. faecalis</i> |
| (H) <i>Lactobacillus sp</i> |
| (I) <i>Lactobacillus sp</i> |

Las cepas aisladas provienen de las siguientes muestras de queso (Tabla 9)

Tabla 9. Muestras de queso (Tomado de Bravo, 2008).

| No muestra y procedencia del queso | Tipo | Fecha de elaboración |
|-------------------------------------|-----------------|----------------------|
| 1) Ranchería "La Tinaja", Michoacán | Artesanal | 28-julio-2005 |
| 2) Población de Cotija, Michoacán | Semi-industrial | 01-agosto-2005 |
| 3) Santa María del Oro, Jalisco | Artesanal | 03-agosto-2005 |

Las cepas A, B, E, G y H fueron aisladas de la muestra 1 mientras que las cepas C, D, F e I fueron aisladas de la muestra 3.

3. Coliformes totales.

Los coliformes son una familia de bacterias que se encuentran comúnmente en plantas, suelos y animales, incluyendo a los humanos, de modo que su presencia es recurrente pero no deseable [Bravo, 2008].

El grupo Coliforme agrupa todas las bacterias entéricas que se caracterizan por tener las siguientes propiedades bioquímicas: aerobias o anaerobias facultativas, bacilos Gram negativos, oxidasa negativos no forman esporas, fermentan la lactosa produciendo ácido láctico y gas. Hay cuatro géneros que representan a la familia de las enterobacterias: *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Escherichia* [Jay *et al*; 2005]

Los coliformes son considerados como indicadores de contaminación fecal y de microorganismos patógenos que pueden estar presentes en productos derivados de la leche cruda. Estos microorganismos pueden llegar a la leche por contaminación de pelos y otras impurezas provenientes de la piel del animal durante la ordeña [Brown & Emberger, 1980], como por el polvo, aire y agua [García *et al*; 2004]. El desarrollo de estos microorganismos dependerá de los siguientes factores: [Brown & Emberger, 1980; García *et al*; 2004]

- Cuentas totales de microorganismos presentes en la leche.
- Condiciones de almacenamiento de la leche, previas a la producción de queso.
- Intensidad de la pasteurización (de llevarse a cabo).
- Niveles de recontaminación del equipo, personal, etc.
- Actividad de las bacterias lácticas: rapidez en la reducción de pH, cantidad de ácido láctico producido, capacidad de producir sustancias inhibitorias tales como ácido fórmico, peróxido de hidrógeno, diacetilo, bacteriocinas entre otros.

Bravo en el 2008, reportó que el número de coliformes totales disminuye drásticamente durante los primeros 90 días del proceso de maduración del queso Cotija, debido en parte

a los cambios fisicoquímicos que ocurren durante el proceso, como la disminución del a_w y aumento de acidez (Figura 7). Cabe mencionar que la pieza de queso seleccionada corresponde a la muestra 1 de la que se aislaron las BAL mencionadas en la Tabla 8.

En la Figura 7 los coliformes están expresados como el Número más probable y su valor se indica arriba de cada barra correspondiente [Bravo, 2008]. En esta misma figura se observa que a los 38 días de maduración la disminución de pH coincide con el decremento del 97 % de la población inicial de los coliformes. A los 58 días la presencia de los mismos es casi nula (<3 NMP), pero el pH aumentó y la acidez es baja. Estos resultados fisicoquímicos entre los 58 y 78 días pueden deberse a las reacciones de trans y desaminación, ocurridos durante la proteólisis originada por la actividad enzimática tanto de origen microbiano como de las enzimas propias de la leche con la que se elaboró el queso [Bravo, 2008].

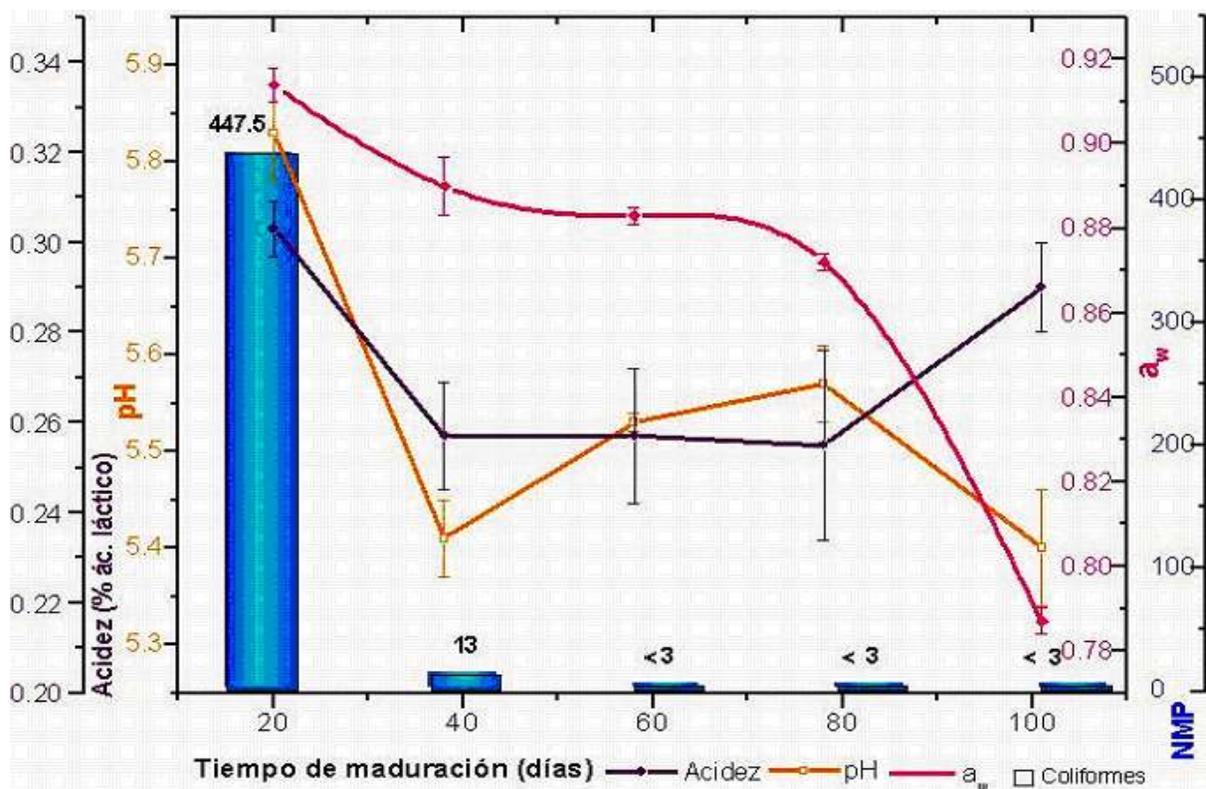


Figura 7. Cuenta de coliformes respecto al tiempo en una muestra de queso Cotija proveniente de la región de origen (Bravo, 2008).

En este trabajo se pretende comprobar si el efecto observado en la disminución de coliformes totales, se debe además de los factores fisicoquímicos, a la presencia de BAL en el queso Cotija que pudieran ser productoras de compuestos antibacterianos.

IV. HIPÓTESIS

Si las BAL de los géneros *Enterococcus* y *Lactobacillus* aisladas del queso Cotija inhiben *in vitro* el crecimiento de microorganismos indicadores como *S. aureus* y *E. coli* entonces, éstas son productoras de compuestos antibacterianos.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar la presencia de actividad antibacteriana en los compuestos extracelulares producidos por BAL aisladas del queso Cotija.

2. Objetivos particulares.

2.1. Identificación de los bacilos lácticos aislados del queso Cotija mediante métodos bioquímicos.

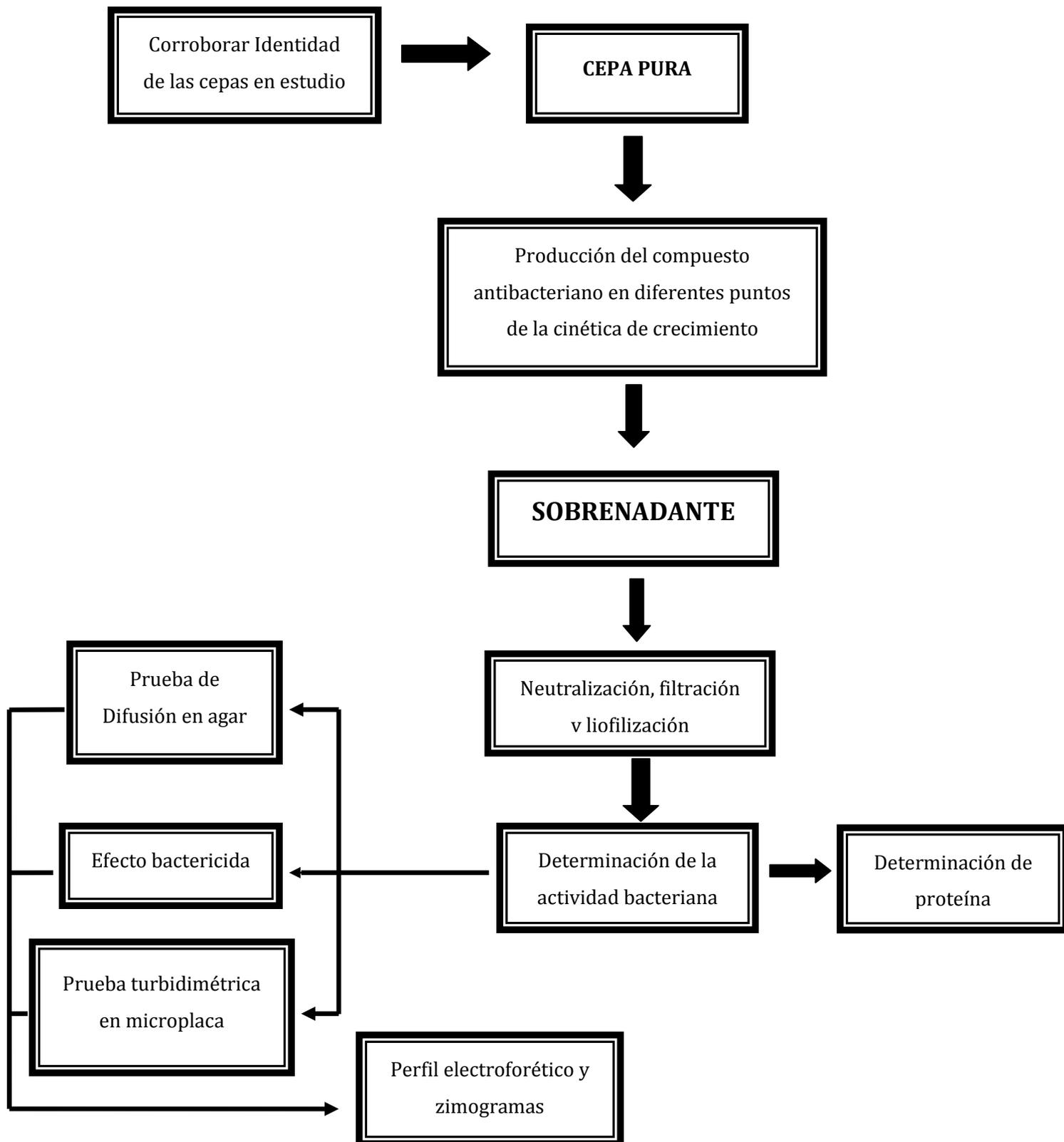
2.2. Determinación de la cinética de crecimiento y producción de la actividad antibacteriana de las BAL aisladas del queso Cotija. Determinar la producción del compuesto antibacteriano en diferentes puntos de la cinética de crecimiento

2.3. Determinar la actividad específica antibacteriana sobre microorganismos indicadores (*S. aureus* y *E. coli*) utilizando la técnica turbidimétrica en microplaca y la prueba presuntiva por difusión en agar.

2.4. Determinar si la actividad inhibitoria de los microorganismos del queso Cotija es bactericida.

2.5 Corroborar la naturaleza proteínica de la actividad antibacteriana extracelular a través de zimogramas y perfil electroforético.

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Descripción de las muestras

Los microorganismos fueron aislados de queso Cotija proveniente de la zona de JAL-MICH, la región de origen (Tabla 10) [Bravo, 2008].

Seis de los nueve microorganismos corresponden al género *Enterococcus*, siendo 3 cepas de la especie *faecalis* y 3 de la especie *faecium*.

Las tres cepas restantes corresponden al género *Lactobacillus*. En la Tabla 10 se resumen los nombres de las cepas utilizadas.

Tabla 10. Cepas analizadas aisladas del queso Cotija

| CEPA | |
|----------|------------------------------|
| A | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| B | <i>Enterococcus faecium</i> |
| C | <i>Enterococcus faecium</i> |
| D | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| E | <i>Enterococcus faecium</i> |
| F | <i>Lactobacillus sp</i> |
| G | <i>Enterococcus faecalis</i> |
| H | <i>Lactobacillus sp</i> |
| I | <i>Lactobacillus sp</i> |

2. Conservación de las cepas en estudio

La colecta de células para ser almacenadas se hizo cuando se alcanzó una densidad óptica (600 nm) entre 2.3 y 2.5, ésta corresponde a fase logarítmica de crecimiento [Bravo,2008]

Cinco de las cepas del género *Enterococcus* fueron almacenadas a -20⁰C en viales con esferas huecas de vidrio en caldo APT (All Purpose Tween, DIFCO) con glicerol al 15 % (v/v) como crioprotector. Las tres cepas del género *Lactobacillus* así como una cepa del género

Enterococcus fueron almacenadas a -20°C en viales con esferas huecas de vidrio en caldo MRS (Man Rogosa Sharpe, OXOID) con glicerol al 15 % (v/v), de acuerdo a lo recomendado por Bravo en el 2008.

Los microorganismos indicadores utilizados corresponden a *S. aureus* ATCC65385P (cepario FES-Cuautitlán) y *E. coli* (DH5 α proporcionado por la Facultad de Química, UNAM).

Las cepas de los microorganismos indicadores fueron almacenados a -20°C en viales con esferas de vidrio, en caldo BHI (Brain Heart Infusion, DIFCO) con glicerol al 15 % (v/v) para *S. aureus*, y en caldo Luria (extracto de levadura, NaCl, Bacto triptona, pH 7.5) con glicerol al 15 % (v/v) para *E. coli*.

3. Identificación de las BAL aisladas del queso Cotija.

Las cepas del género *Enterococcus* ya habían sido identificadas por métodos moleculares con la secuenciación de la región V3 del gen ADNr 16S [Zúñiga, 2009].

Las cepas aisladas del queso Cotija del género *Lactobacillus*, fueron caracterizadas por medio de:

1. Métodos bioquímicos (API®).
2. Morfología microscópica - tinción de Gram.
3. Morfología colonial

4. Cinética de crecimiento de las cepas aisladas del queso Cotija.

Se realizaron preinóculos partiendo de los microorganismos congelados conservados en glicerol adicionando 2-3 esferas de vidrio por cada 20 mL de caldo APT ó MRS, según fue el caso. Los preinóculos se incubaron a 250 rpm, 37°C durante 24 h (INNOVA 4000, New Brunswick Scientific). Posteriormente a 100 mL de caldo fresco APT ó MRS, según fue el caso, se le adicionó el 2 % del preinóculo y se tomarán alícuotas de 1 mL a las 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 24 h de fermentación, bajo las siguientes condiciones de incubación: 250 rpm, 37°C . Se determinó el pH (34 pH Meter Beckman) y la densidad óptica de cada uno de los

puntos de la cinética de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm (Espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 3A). Se elaboraron gráficas de densidad óptica y pH contra tiempo.

5 Tratamiento del sobrenadante

Se tomó una alícuota de 10 mL de 5 ó 6 puntos de la cinética de crecimiento. Dicha alícuota se centrifugó a 8,500 rpm durante 15 min a 4⁰C (Biofuge Primo R). Los sobrenadantes obtenidos se llevaron a pH 7 con NaOH al 50 % y posteriormente, se filtraron con una membrana de 0.45 µm (Millipore). Las muestras se congelaron a -70⁰C y se liofilizaron (LABCONCO) hasta su uso. Finalmente el sobrenadante liofilizado fue resuspendido en 1 mL PBS 100 mM, pH 7 (concentración 10x).

6. Determinación de proteína

Se utilizó el método de Bradford, que en resumen consistió en tomar 800 µL de la muestra diluida (dilución 10⁻²) y se le adicionó 200 µL del reactivo de Bradford (BIORAD). La concentración de proteína se determinó a una longitud de onda de 595 nm (Espectrofotómetro Spectronic 21D). Los valores obtenidos se interpolaron en una curva patrón de albúmina sérica bovina (0-10 µg/mL).

7. Prueba presuntiva por difusión en agar

Para determinar el efecto antibacteriano se realizaron pruebas de difusión en agar [Bibek, 1992] con las fracciones obtenidas de cada ensayo, en los diferentes tiempos de cultivo de los microorganismos en estudio. En esta prueba se utilizaron los microorganismos indicadores *S. aureus* y *E. coli*. Se hicieron diluciones decimales de 10⁻¹ a 10⁻⁶ en solución salina estéril (0.85%, pH 7) 20 µL de cada una de estas diluciones fueron colocadas en placas de agar BHI al 1% e incubadas a 37^oC por 24 h. Se seleccionó la dilución de los microorganismos indicadores en función de la homogeneidad del césped bacteriano obtenido.

Para elaborar las cajas donde se realizó el ensayo de difusión, se colocaron 20 mL de agar BHI al 1 % y se dejó solidificar. Posteriormente se adicionó 10 mL de agar suave al 0.8 % con la concentración de células de *S. aureus* y *E. coli* seleccionada. Con un penicilindro se hicieron pozos sobre la doble capa de agar, en cada pozo se adicionaron 200 μ L de cada una de los sobrenadantes obtenidos. Las cajas se incubaron a 37⁰C por 24 h (Gravity Convection E-71).

Finalmente se midió el diámetro del halo de inhibición de los microorganismos indicadores y se relacionó la cantidad de proteína por milímetro de inhibición.

8. Prueba turbidimétrica en microplaca

Lee y Yang en el 2002 reportaron la actividad lítica de lisozima utilizando un lector de placas y células de *Micrococcus lysodeikticus* como microorganismo indicador, observando la disminución en la absorbancia ($\lambda=595\text{nm}$) con respecto al tiempo. Una unidad enzimática la definieron como la cantidad de enzima que provoca la disminución en la absorbancia de 0.001/min.

Se determinó utilizando como base, este método que determina la actividad lítica de los sobrenadantes obtenidos de las cinéticas de crecimiento de las cepas en estudio. Se utilizaron células de *S. aureus* y *E. coli* como microorganismos indicadores; las células fueron resuspendidas en buffer PBS (100 mM, pH 7) y se ajustaron a una D.O.₆₀₀ de 1.0-1.5. En cada uno de los pozos de la microplaca se colocaron 50 μ L del sobrenadante y 100 μ L de las células resuspendidas de los microorganismos indicadores. La microplaca fue colocada en un lector de placas (Benchmark Microplate Spectrophotometer) y se tomaron lecturas durante 20 min con intervalos de lectura de 1 min. Los datos colectados fueron graficados en función del tiempo, para calcular las unidades de actividad lítica. Para determinar la actividad específica se relacionó el contenido de proteína con las unidades de actividad.

Una vez obtenidos los resultados de la prueba turbidimétrica y de difusión en agar se establecieron las cepas que tuvieron mayor actividad y al tiempo en el que esto ocurrió.

9. Determinación del efecto antibacteriano sobre un microorganismo indicador

Se realizó un preinóculo partiendo de las cepas conservadas adicionando 2-3 esferas de vidrio por cada 20 mL de caldo MRS. Los preinóculos se incubaron a 250 rpm, 37⁰C durante 24 h. Posteriormente a 100 mL de caldo fresco MRS se le adicionó el 2% del preinóculo. El tiempo de fermentación fue diferente para las cuatro cepas a analizar; para la cepa F (*Lb. paracasei*) el tiempo de fermentación fue de 14 h mientras que la cepa G (*E. faecalis*) fue de 8 h, la cepa H (*Lb. brevis*) fue de 14 h y finalmente la cepa I (*Lb. pentosus*) el tiempo de fermentación fue de 10 h.

Una vez realizadas las fermentaciones el sobrenadante fue recolectado por centrifugación a 8,500 rpm durante 15 min a 4⁰C. Se ajustó el pH a 7 con NaOH al 50% y se filtraron con una membrana de 0.45 µm. Finalmente al sobrenadante se le adicionó NH₄ (SO₄)₂ al 40 % de saturación a 4⁰C, con agitación constante. Posteriormente se centrifugó a 20,000 rpm por 30 min a 4⁰C. El precipitado obtenido fue dializado con una membrana de 10 kDa durante 12 h contra agua destilada. Se realizaron curvas de crecimiento de los microorganismos indicadores en caldo BHI para *S. aureus* y caldo Luria para *E. coli*. Se adicionó 1 mg de proteína total de la fracción dializada en el punto en donde los microorganismos indicadores se encontraban en su fase exponencial temprana. Se elaboraron gráficas de densidad óptica contra tiempo [Chien *et al*; 2005]. Para determinar la velocidad de crecimiento se graficó el logaritmo natural de la densidad óptica contra tiempo. Un efecto bactericida ocasionaría una pendiente negativa en la cinética de crecimiento mientras que un efecto bacteriostático provocaría sólo una disminución en la velocidad de crecimiento.

10. Perfil electroforético

10.1 Determinación del peso molecular del compuesto antibacteriano

Con la finalidad de obtener el perfil electroforético de los péptidos presentes en el sobrenadante se realizó una precipitación con ácido tricloro acético (TCA) al 20 %. Esta precipitación consistió en añadir el TCA en los sobrenadantes a estudiar y dejar reposar

por un periodo de 1 h a 4⁰C; transcurrido este tiempo se recolectó el precipitado mediante la adición de acetona y una centrifugación a 8500 rpm por 30 min. Finalmente se adicionó NaOH al 50 % para neutralizar el precipitado.

Para determinar el peso molecular de las proteínas presentes en las cepas que presentaron mayor actividad se realizaron geles de Tris-Tricina SDS-PAGE al 15 % [Schägger and Von, 1987] (Tablas 11, 12, 13, 14, 15 y 16).

Tabla 11. Preparación de la Acrilamida

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|----------------|----------------|----------|
| Acrilamida | 37.5 % T | 37.125 g |
| Bis-acrilamida | 1 % C | 0.375 g |
| Agua destilada | c. b. p 100 mL | |

Tabla 12. Buffer del gel (Tris-HCl/ SDS buffer)

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|-----------------------------|---------------|----------|
| Tris-base | 3 M | 36.4 g |
| Agua destilada | | 60 mL |
| Ajustar pH 8.45 con HCl 1 N | | |
| Agua destilada c.b.p 100 mL | | |
| Filtrar solución | | |
| SDS | 0.3 % | 0.3 g |

Tabla 13. Preparación del gel Tris-Tricina al 15 %

| Reactivo | Gel Separador | Gel concentrador |
|----------------------|---------------|------------------|
| Agua destilada | 0.96 mL | 4.98 mL |
| Buffer del gel | 5.312 mL | 1.98 mL |
| Glicerol al 80% | 1.684 mL | ----- |
| Acrilamida al 37.5 % | 8 mL | 1.04 mL |
| APS 10% | 80 µL | 42.56 µL |
| TEMED | 10.56 µL | 4.8 µL |
| Vol. final | 16 mL | 8 mL |

A las muestras analizadas se les adicionó 8 μ L de buffer de carga (50 mM de Tris-HCl pH 6.8, 2 % SDS, 2.5 % glicerol, 0.5 % β -mercaptoetanol y 0.5 % de azul de bromofenol) Las muestras fueron calentadas a ebullición por 5 min y posteriormente, cargadas al gel. En la Tabla 14 se describe la preparación del buffer de muestra.

Tabla 14. Buffer de muestra (4x) para 10 mL

| Reactivo | Cantidad |
|------------------------|----------|
| Agua desionizada | 4 mL |
| Tris-HCl 0.15 M pH 6.8 | 2 mL |
| Glicerol | 2.4 mL |
| SDS 10% | 1.0 mL |
| B- mercaptoetanol | 0.2 mL |
| Coomassie G-250 | 0.4 g |

Se utilizaron buffers diferentes para el reservorio interior y exterior de la cámara. En las Tablas 15 y 16 se describe su preparación.

Tabla 15. Buffer cátodo 10x (reservorio superior/interior)

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|----------------|----------------|----------|
| Tris-base | 100 mM | 6.055 g |
| Tricina | 100 mM | 8.96 g |
| SDS | 0.1 % | 0.5 g |
| Agua destilada | c. b. p 500 mL | |

Tabla 16. Buffer ánodo 10x (reservorio interior/exterior)

| Reactivo | Concentración | Cantidad |
|------------------------------|----------------|----------|
| Tris-base | 200 mM | 121.1 g |
| Agua destilada | c. b. p 500 mL | |
| Ajustar pH a 8.9 con HCl 1 N | | |

El gel se corrió a 80 V durante 5 h. Una vez corrido el gel se tiñó en una solución de azul Coomassie R250 al 2.5 % en ácido acético, metanol y agua (4:2:4) con agitación. Para revelar el gel se utilizó una solución desteñidora que contiene metanol, ácido acético glacial y agua (4:2:4).

11. Zimogramas

Para corroborar la actividad del compuesto antibacteriano de las cepas seleccionadas, se realizaron dos técnicas por separado. Para obtener el compuesto antibacteriano:

1) Se realizó una precipitación del sobrenadante con 40 % de sulfato de amonio, el pellet se resuspendió en buffer PBS pH 7 (concentración 10x) y se dializó utilizando una membrana de diálisis de 1 kDa. Las muestras analizadas se corrieron en geles Tris-Tricina SDS-PAGE al 15 % [Schägger *et al*, 1987]. Se utilizó un marcador Ultra Low de peso molecular (BioRad No catálogo 161-0326) con un intervalo de 26.63 a 3.5 kDa. Los geles se corrieron a 80 V por 5 h. La mitad del gel se tiñó con una solución de azul de Coomassie R250, la otra parte del gel sin teñir se colocó en una solución de ácido acético, agua desionizada e isopropanol (2:6:2) hasta eliminar el exceso del frente del gel, posteriormente se colocó el gel en una caja petri con células de *S. aureus* (10^6 UFC/mL) embebidas en agar BHI.

2) células de *S. aureus* (10^6 UFC/mL) fueron embebidas en geles Tris-Tricina SDS-PAGE al 15 % [Schägger *et al*, 1987]. Para obtener el compuesto antibacteriano se realizó una precipitación del sobrenadante con 40 % de sulfato de amonio, una vez precipitado se resuspendió en buffer PBS pH 7 (concentración 10x) y dializado utilizando una membrana de diálisis de 1 kDa.

En este método las células del microorganismo indicador se resuspendieron en el gel separador y se dejó polimerizar. Se añadió el buffer de carga a los sobrenadantes a analizar y se corrieron a 80 V por un periodo de 5 h. Se tiñeron con una solución de KOH 1.0% y azul de Metileno 0.1% durante 20 min. Para revelar el gel, se lavó con agua destilada durante 2-4 h. La aparición de bandas claras indicó la presencia de actividad

lítica sobre el microorganismo indicado. Las bandas obtenidas se compararon con un marcador de peso molecular Ultra Low (Bio-rad No catálogo 161-0326).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación de las cepas aisladas del queso Cotija

Los microorganismos aislados del queso Cotija del género *Lactobacillus*, fueron caracterizadas por medio de métodos bioquímicos (API®) con los siguientes resultados:

- ❖ *Lactobacillus pentosus* (99.9% identidad)
- ❖ *Lactobacillus paracasei* (99.9% identidad)
- ❖ *Lactobacillus brevis* (99.9% identidad)

Con la observación microscópica de los microorganismos se corroboró que las cepas del género *Enterococcus* que ya habían sido previamente identificadas por métodos moleculares [Zúñiga, 2008], cumplían con las características morfológicas descritas en la literatura. Ver Tabla 17 y Figura 8.

Para el caso de las cepas del género *Lactobacillus*, con la identificación morfológica se corroboró la identificación bioquímica (API) de las mismas determinando así que se trataban de bacilos cortos Gram (+).

Una vez realizada la identificación de las 9 cepas a estudiar, 6 del género *Enterococcus* y 3 del género *Lactobacillus*, se realizaron las cinéticas de crecimiento.

1.2. Morfología microscópica, tinción de Gram (Tabla17)

Tabla 17. Morfología microscópica de los géneros de las cepas en estudio

| <i>Enterococcus</i> | <i>Lactobacillus</i> |
|--|-------------------------------|
| Células esféricas u ovoides presentes en pares o cadenas cortas. Gram positivas | Bacilos cortos Gram positivos |



Género *Lactobacillus*



Género *Enterococcus*

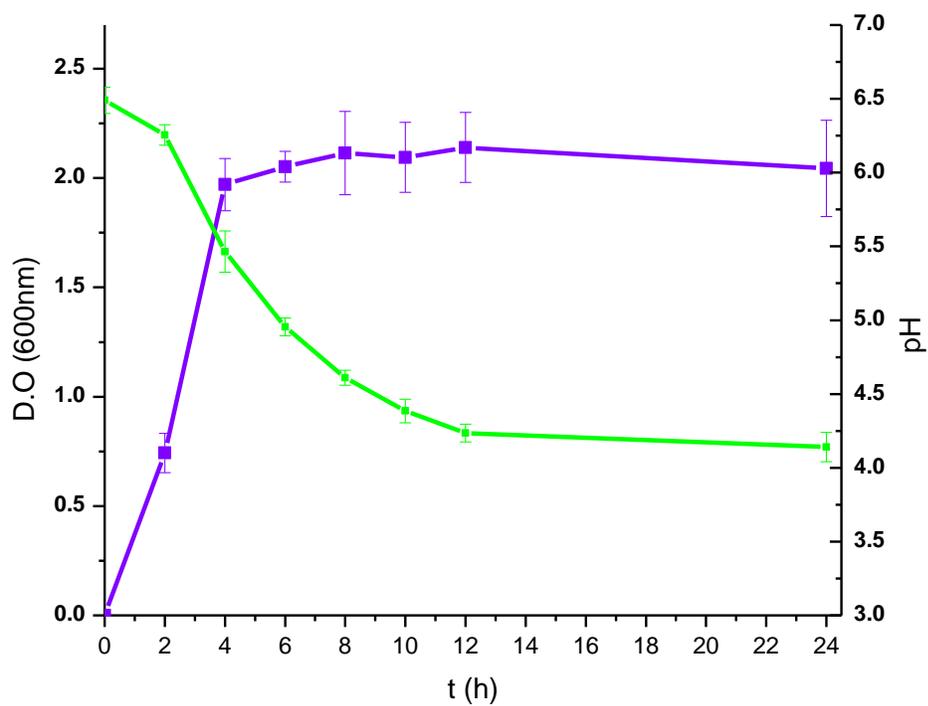
Figura 8. Morfología microscópica a 100x de los géneros en estudio

2. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas del queso Cotija

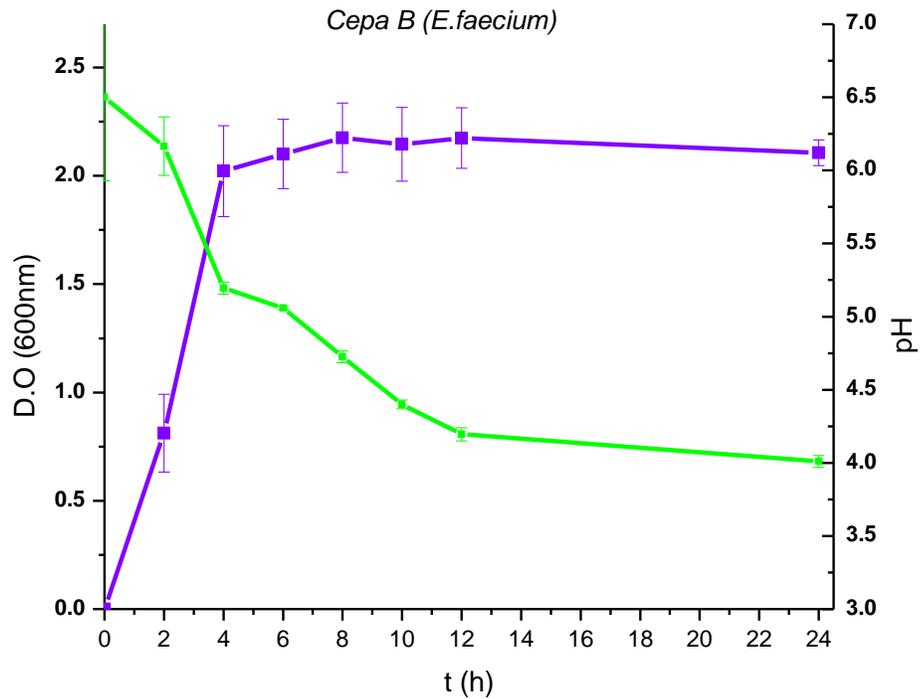
Se realizaron las cinéticas de crecimiento de cada uno de los microorganismos estudiados. Se muestreó cada 2 horas en un periodo de 12 horas y un muestreo a las 24 h; las condiciones empleadas fueron las siguientes: 100 mL de medio MRS para las cepas del género *Lactobacillus* (*paracasei*, *brevis* y *pentosus*) y una cepa del género *Enterococcus* (*faecalis*), en matraces de 500 mL; y 100 mL de medio APT para las cepas del género *Enterococcus* (*faecalis* y *faecium*), en matraces de 500 mL. Se utilizaron los medios MRS y APT, debido a que Bravo (2008), quien aisló los microorganismos con los que se realizó el presente estudio, determinó que eran los que propiciaban un mejor crecimiento.

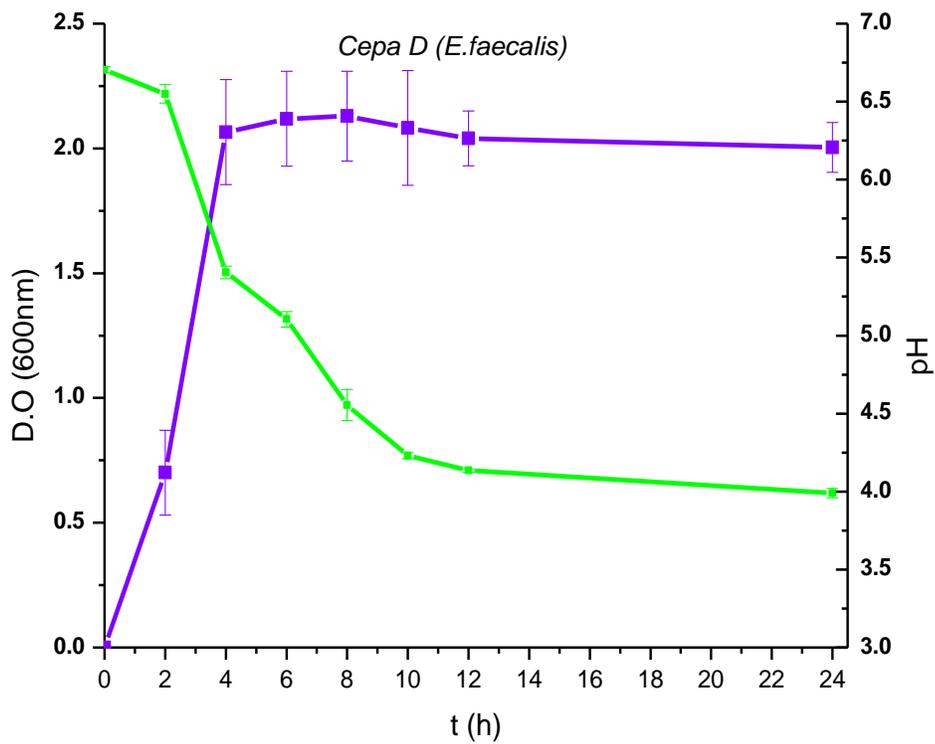
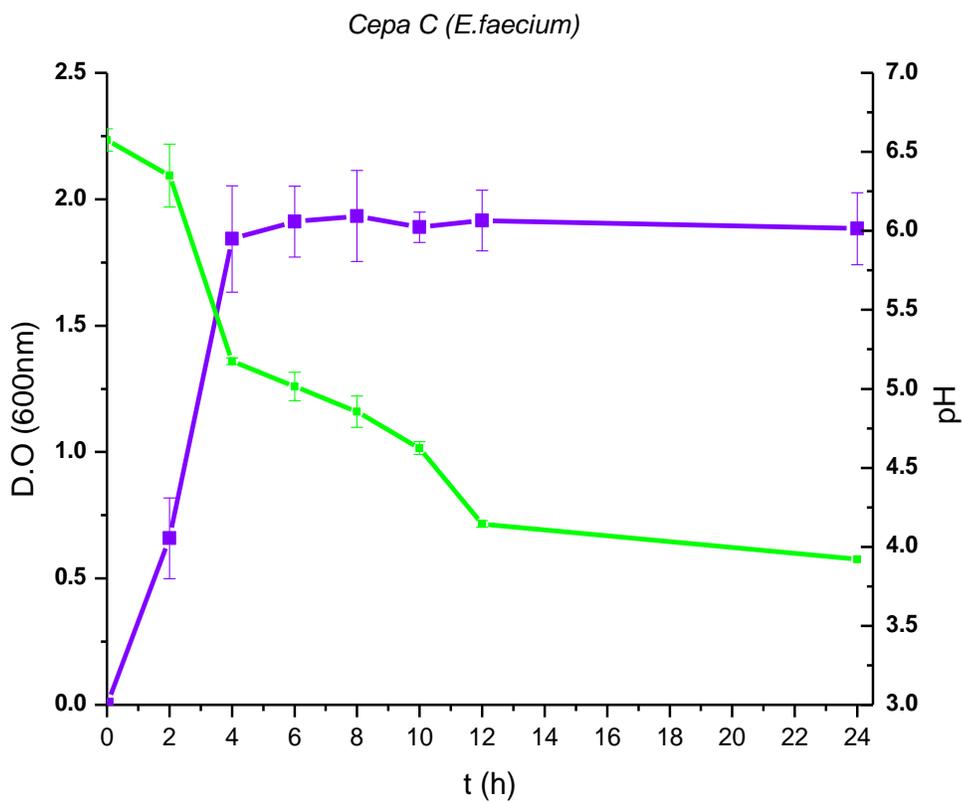
Se realizaron preinóculos partiendo de las cepas conservadas adicionando 2-3 esferas de vidrio por cada 20 mL de caldo APT ó MRS, según el caso. Los preinóculos se incubaron a 250 rpm, 37°C durante 24 h Posteriormente a 100 mL de caldo fresco de APT ó MRS, se le adicionaron el 2% del preinóculo y se tomaron alícuotas de 1 mL en 6 diferentes tiempos de la cinética de crecimiento de las cepas en estudio bajo las siguientes condiciones de incubación: 250 rpm, 37°C. Se determinó el pH y la densidad óptica de cada uno de los puntos de la cinética de crecimiento a una longitud de onda de 600 nm, posteriormente se elaboraron gráficas de densidad óptica contra tiempo. Las cinéticas de crecimiento se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la Figura 9.

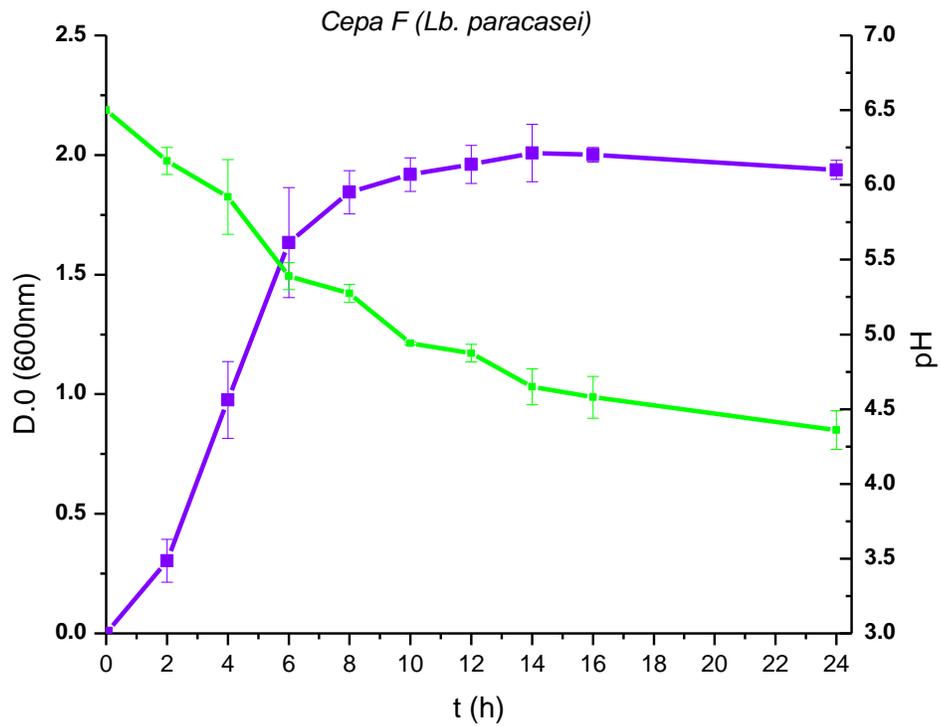
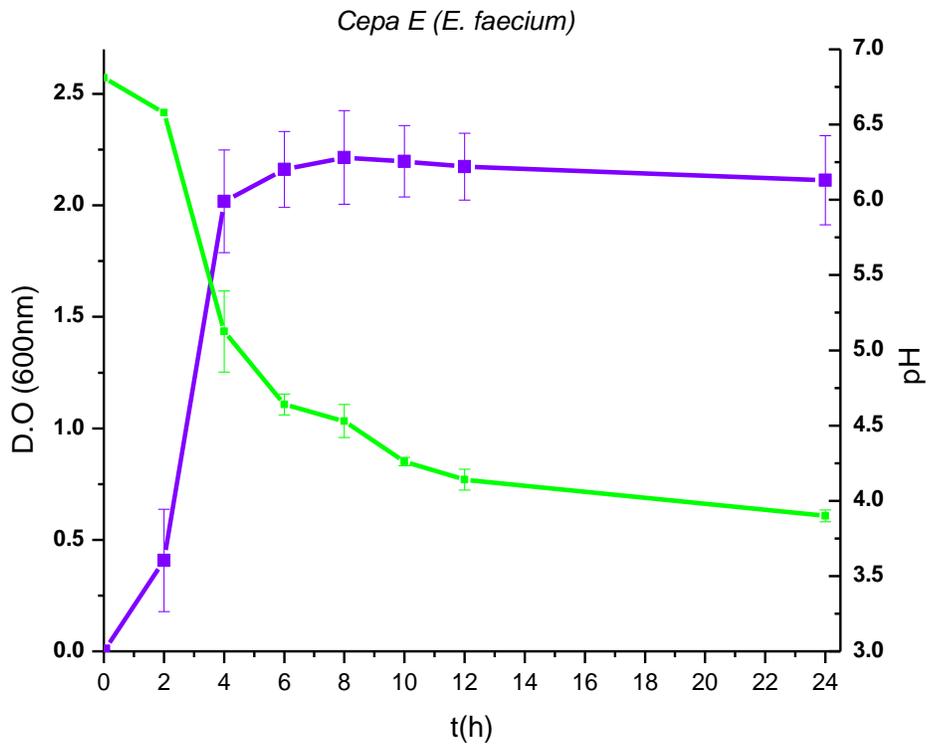
Cepa A (E.faecalis)

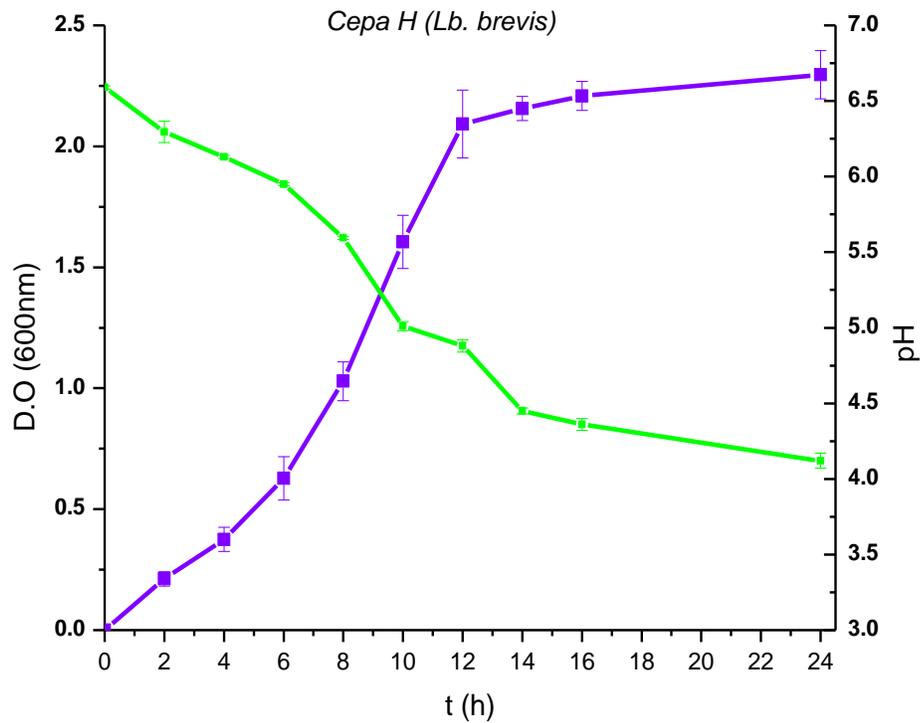
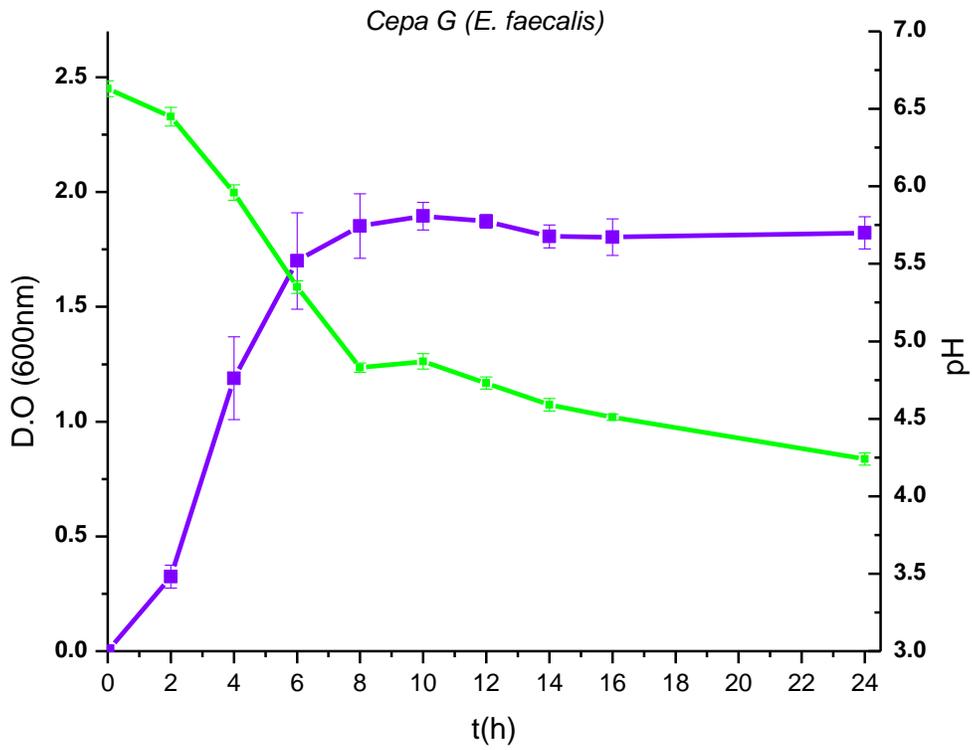


Cepa B (E.faecium)









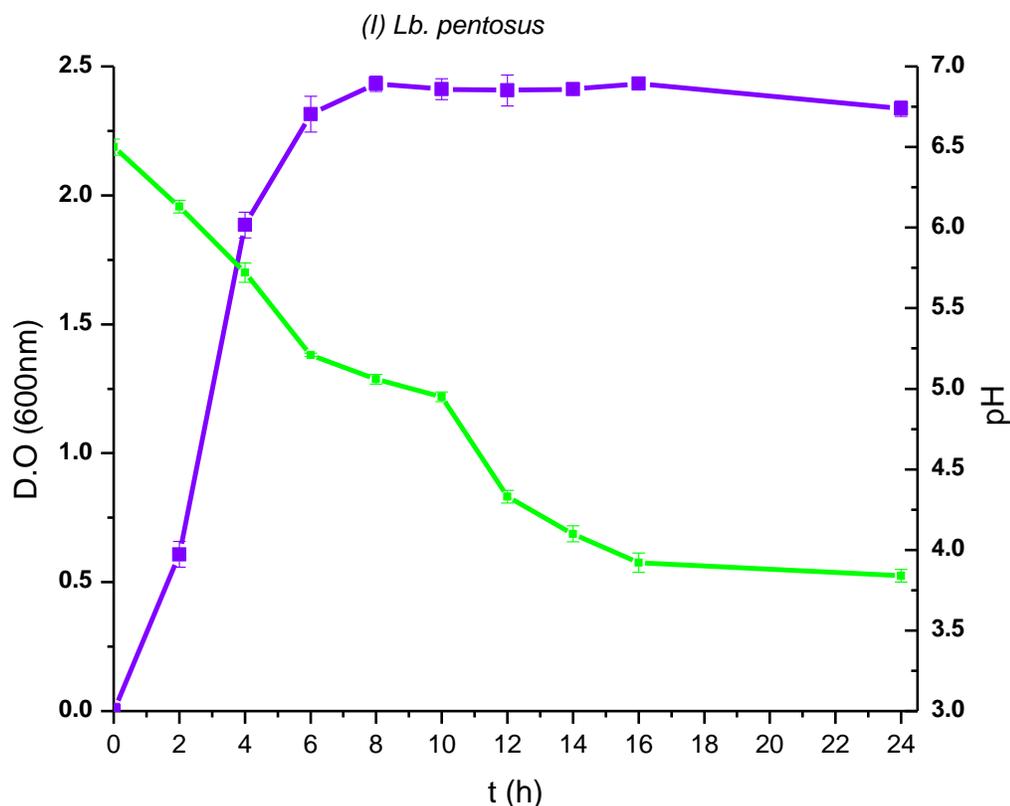


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de las cepas aisladas del queso Cotija. 100 mL de medio APT (cepas A-E) o MRS (cepas F-I) en matraces de 500 mL. Agitación 250 rpm, 37°C. Se muestra el promedio y desviación estándar de 3 réplicas.

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento realizadas para cada uno de los microorganismos en estudio, se observó que las cepas del género *Enterococcus* y *Lactobacillus* alcanzan una densidad óptica (600nm) de 2.0 a las 6 h de crecimiento lo cual, demuestra la buena adaptación del inóculo al medio. La cinética de crecimiento de cada uno de los microorganismos de estudio tuvo un comportamiento diferente, aunque las condiciones de cultivo (temperatura y agitación) fueron las mismas. Mientras algunas alcanzaron la fase estacionaria a las 4 horas, otras lo hicieron hasta las 12 horas (p. ej. *Lb. brevis*). Se ha reportado que la mayor producción de compuestos antibacterianos se encuentra tanto en la fase logarítmica tardía, como en la estacionaria temprana [Maisnier-Patin, *et al.*, 1996, Okkers, *et al.*, 1999], es por esto que se tomaron 6 puntos de la cinética de crecimiento los cuales se encontraban en alguna de las fases mencionadas (Tabla 16).

Con las cinéticas de crecimiento de la cepas en estudio, se determinaron los tiempos para tomar alícuotas de 10 mL de las fermentaciones y evaluar el efecto antibacteriano (Tabla 18).

Tabla 18. Tiempos de cosecha de los sobrenadantes de las cepas en estudio

| tiempo | CEPA A | CEPA B | CEPA C | CEPA D | CEPA E | CEPA F | CEPA G | CEPA H | CEPA I |
|--------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|
| 1 | 4h A1 | 4h B1 | 4h C1 | 5h D1 | 5h E1 | 6h F1 | 6h G1 | 6h H1 | 6h I1 |
| 2 | 6h A2 | 6h B2 | 6h C2 | 6h D2 | 6h E2 | 8h F2 | 8h G2 | 8h H2 | 8h I2 |
| 3 | 8h A3 | 8h B3 | 8h C3 | 8h D3 | 8h E3 | 10h F3 | 10h G3 | 10h H3 | 10h I3 |
| 4 | 10h A4 | 10h B4 | 10h C4 | 10h D4 | 10h E4 | 12h F4 | 12h G4 | 12h H4 | 12h I4 |
| 5 | 12h A5 | 12h B5 | 12h C5 | 12h D5 | 12h E5 | 14h F5 | 14h G5 | 14h H5 | 14h I5 |
| 6 | 24 h A6 | 24h B6 | 24h C6 | 24h D6 | 24h E6 | 24h F6 | 24 h G6 | 16h H6 | 16h I6 |

3. Determinación de proteína.

Una vez realizado el tratamiento del sobrenadante como se describió en la metodología, se determinó el contenido de proteína de cada una de las preparaciones concentradas usando el método de Bradford (Tabla 19). La clave de cada preparación corresponde a los tiempos indicados en la Tabla 18.

Tabla 19. Cantidad de proteína de los sobrenadantes concentrados resuspendidos en PBS 100 mM pH 7.0

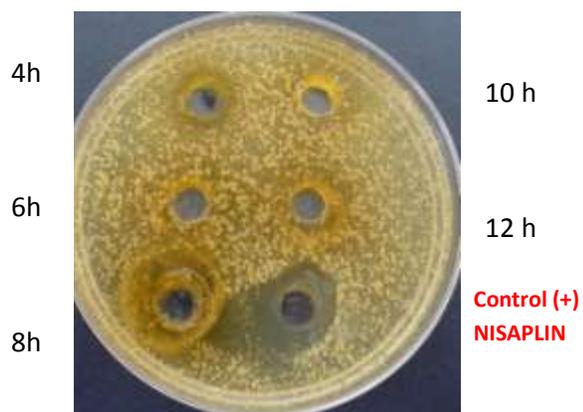
| CEPA | mg prot/mL | CEPA | mgprot/mL |
|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|-----------|
| A1 | 0.63 | B1 | 0.77 | C1 | 0.87 | D1 | 0.49 | E1 | 0.6 |
| A2 | 0.53 | B2 | 0.72 | C2 | 0.74 | D2 | 0.7 | E2 | 0.61 |
| A3 | 0.8 | B3 | 0.89 | C3 | 0.75 | D3 | 0.77 | E3 | 0.57 |
| A4 | 0.56 | B4 | 0.8 | C4 | 0.74 | D4 | 0.78 | E4 | 0.78 |
| A5 | 0.87 | B5 | 0.6 | C5 | 0.8 | D5 | 0.85 | E5 | 0.66 |
| A6 | 0.76 | B6 | 0.62 | C6 | 0.64 | D6 | 0.82 | E6 | 0.65 |
| F1 | 0.88 | G1 | 0.64 | H1 | 0.74 | I1 | 0.88 | | |
| F2 | 0.81 | G2 | 1 | H2 | 0.91 | I2 | 1.1 | | |
| F3 | 1.04 | G3 | 0.96 | H3 | 1 | I3 | 1 | | |
| F4 | 0.85 | G4 | 0.9 | H4 | 1.18 | I4 | 1.26 | | |
| F5 | 0.82 | G5 | 1.12 | H5 | 1.26 | I5 | 1.04 | | |
| F6 | 0.92 | G6 | 1.03 | H6 | 1.26 | I6 | 0.99 | | |

4. Prueba Presuntiva por difusión en agar

Para determinar de forma cualitativa el efecto inhibitorio del sobrenadante concentrado de los microorganismos en estudio a diferentes tiempos de cosecha sobre el crecimiento de los microorganismos indicadores empleados (*S.aureus* y *E.coli*), se utilizó la prueba presuntiva por difusión en agar. Se utilizaron estos microorganismos como indicadores debido a que previamente se determinó que los sobrenadantes de las BAL en estudio presentaban actividad inhibitoria sobre éstos, mientras que no había un efecto sobre otros como *Listeria monocytogenes* (Hernández, A; 2010). Para esta prueba se utilizaron como controles positivos Nisaplin® y lisostafina usando como microorganismo indicador *S. aureus*. Tanto el Nisaplin® como la lisostafina tienen efecto inhibitorio contra

microorganismos Gram positivos ya que impiden el transporte de moléculas de peptidoglucano y así evitan la formación de la pared celular Para el caso de *E. coli*, ninguno de los compuestos utilizados como controles tenían un efecto inhibitorio del crecimiento.

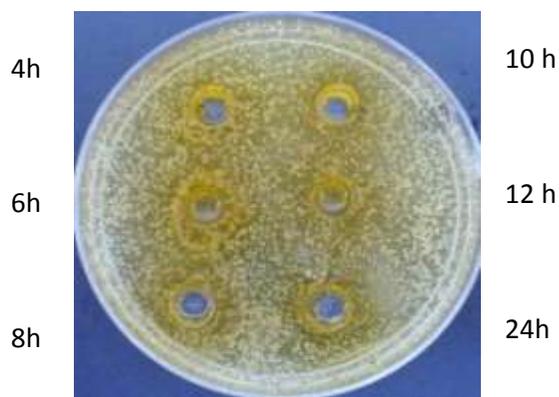
En la Figura 10 se observa las placas obtenidas en la prueba presuntiva por difusión en agar a las 24 h usando como microorganismo indicador *S. aureus* y en la Figura 11 se observan los resultados obtenidos utilizando como microorganismo indicador *E. coli*. En cada placa se probaron los sobrenadantes de los diferentes tiempos de cosecha (Tabla 18).Un efecto inhibitorio se observó como un halo alrededor del pozo en donde no hubo crecimiento bacteriano.



(A) *E. faecalis*



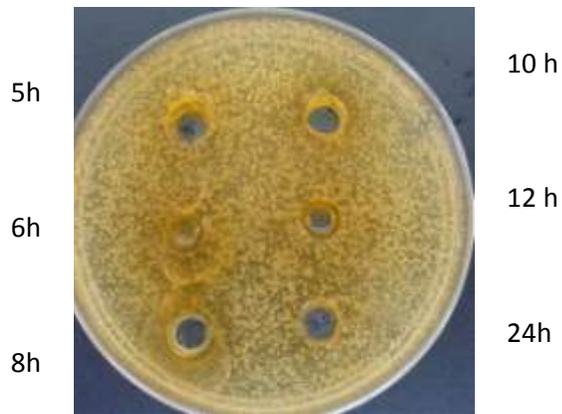
(B) *E. faecium*



(C) *E. faecium*



(D) *E. faecalis*



(E) *E. faecium*



(F) *Lb. paracasei*



(G) *E. faecalis*

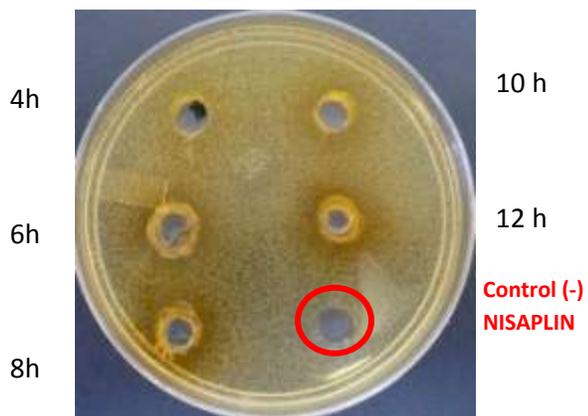


(H) *Lb. brevis*

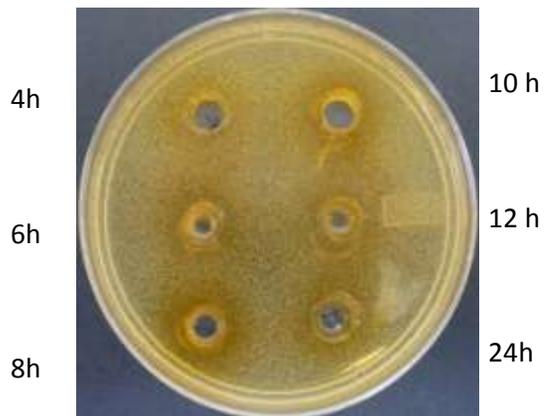


(I) *Lb. pentosus*

Figura 10. Prueba presuntiva de inhibición por difusión en agar. Microorganismo indicador *S. aureus*. En cada pozo se depositaron 200 μ L de sobrenadante concentrado. T incubación 37°C, t de incubación 24 h.



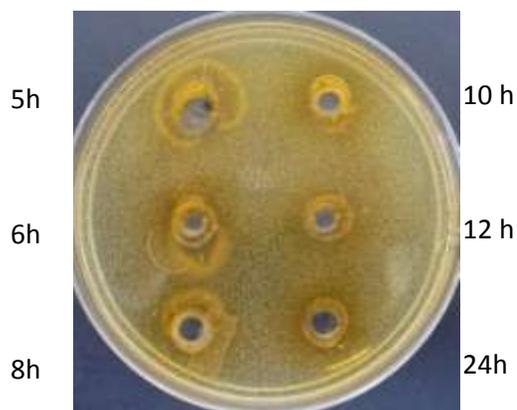
(A) *E. faecalis*



(B) *E. faecium*



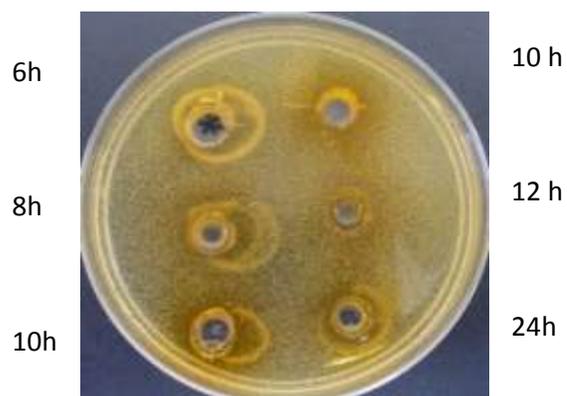
(C) *E. faecium*



(D) *E. faecalis*



(E) *E. faecium*



(F) *Lb. paracasei*

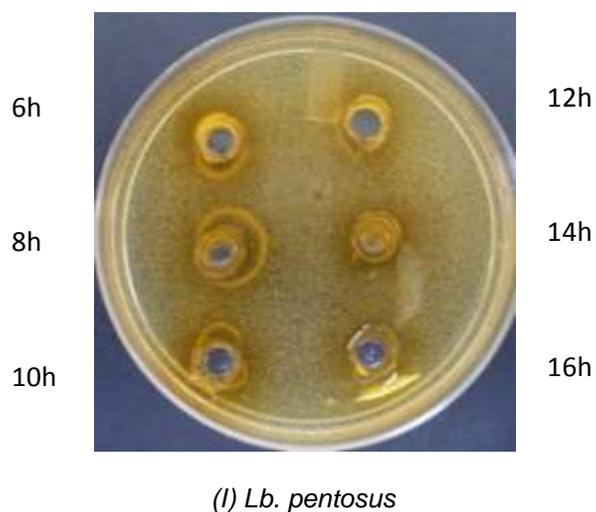
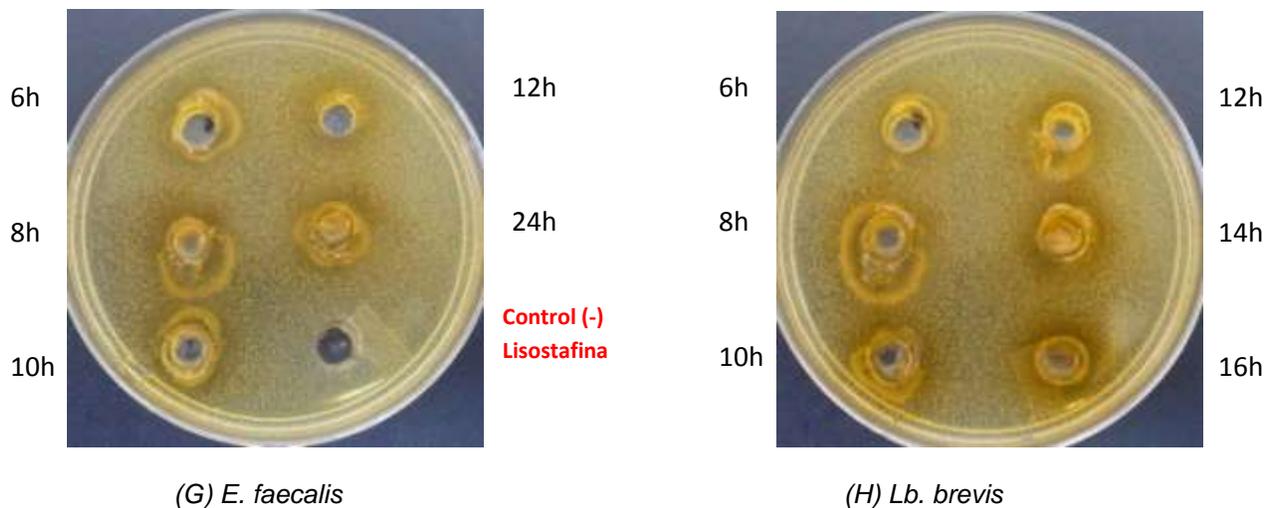


Figura 11. Prueba presuntiva de inhibición por difusión en agar. Microorganismo indicador *E. coli*. En cada pozo se colocaron 200 μ L de sobrenadante concentrado. T incubación 37^oC, t de incubación 24 h.

En las Tablas 20 y 21 se resumen los diámetros de inhibición obtenidos por las cepas en estudio utilizando como microorganismo indicador *S. aureus* y *E. coli* respectivamente.

Tabla 20. Halos de inhibición registrados de las cepas en estudio contra el microorganismo indicador *S. aureus* a las 24 h.

| Tiempo (h) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 24 |
|--------------------------|------|-------|------|------|------|------|-----|------|
| (A) <i>E. faecalis</i> | 1 mm | - | 2mm | - | - | | | - |
| (B) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (C) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (D) <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (E) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | | 2 mm | 4 mm | 2 mm | 2 mm | 3 mm | | 4 mm |
| (G) <i>E. faecalis</i> | | 1.5mm | - | 2mm | - | | | 1 mm |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | | 3 mm | 3 mm | - | 3 mm | 4 mm | 5mm | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | | 6 mm | 6 mm | 3 mm | 4 mm | 4 mm | 4mm | |

No  determinó. [-] Indica que no hubo inhibición.

Tabla 21. Halos de inhibición* registrados de las cepas en estudio contra el microorganismo indicador *E. coli* a las 24 h

| Tiempo (h) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 24 |
|--------------------------|---|------|------|------|------|-----|----|-----|
| (A) <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (B) <i>E. faecium</i> | - | - | 1 mm | - | - | | | - |
| (C) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (D) <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (E) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | | | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | | - | - | 2 mm | - | - | | - |
| (G) <i>E. faecalis</i> | | 3 mm | - | - | - | | | 2mm |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | | - | - | 1 mm | 3 mm | 1mm | - | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | | 2 mm | - | 2 mm | - | 2mm | - | |

*NOTA: Al halo de inhibición reportado se le restó el diámetro del penicilindro con el cual se formaron los pozos. ■ No se determinó. [-] indica que no hubo inhibición.

En la Tabla 22 se resume la relación existente entre el tamaño de los halos de inhibición obtenidos con los sobrenadantes concentrados a diferentes tiempos de incubación en la prueba presuntiva por difusión en agar y la concentración de proteína cuantificada de los diferentes puntos de la cinética de crecimiento de las cepas en estudio.

Tabla 22. Actividad específica [mm/mg proteína] de las cepas en estudio contra los microorganismos indicadores *S. aureus* y *E. coli*. T incubación 37°C, t de incubación 24 h.

| Tiempo (h) | 4 | | 6 | | 8 | | 10 | | 12 | | 14 | | 16 | | 24 | |
|---------------------------|---|---|----|----|------|---|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|
| *Microorganismo indicador | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| (A) <i>E. faecalis</i> | 8 | - | - | - | 12.5 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (B) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | 6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (C) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (D) <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (E) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | ■ | ■ | 11 | - | 24 | - | 10 | 10 | 17 | - | 18 | - | ■ | ■ | 22 | - |
| (G) <i>E. faecalis</i> | ■ | ■ | 12 | 23 | - | - | 10 | - | - | - | ■ | ■ | ■ | ■ | 4 | 10 |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | ■ | ■ | 20 | - | 16 | - | - | 5 | 13 | 13 | 16 | 4 | 20 | - | ■ | ■ |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | ■ | ■ | 34 | 11 | 27 | - | 15 | 10 | 16 | - | 19 | 10 | 19 | - | ■ | ■ |

*NOTA: A representa *S. aureus* B representa *E. coli* No ■ determinó. [-] Indica que no hubo inhibición.

La prueba presuntiva por difusión en agar permitió identificar a los microorganismos productores de agentes antibacterianos extracelulares de manera cualitativa (Figura 10 y 11).

Los sobrenadantes obtenidos de las cepas del género *Lactobacillus* (*paracasei*, *brevis* y *pentosus*) tuvieron un marcado efecto inhibitorio en contra del microorganismo indicador

S. aureus, siendo *Lactobacillus pentosus* el microorganismo que presentó la mayor actividad específica contra este microorganismo (Tabla 22Figura 10).

Para el caso del microorganismo indicador *E. coli*, el sobrenadante de la cepa G (*Enterococcus faecalis*) fue el que mayor actividad específica presentó contra éste. Las especies del género *Lactobacillus* también tuvieron un efecto inhibitorio pero en menor proporción.

El tiempo de cosecha del sobrenadante en el cual se presentó mayor inhibición de los microorganismos indicadores, fue en el mayor número de casos cuando las cepas en estudio se encontraban en la fase estacionaria temprana. Este hecho indica que la producción del compuesto antibacteriano está relacionado con el desarrollo celular. Al inicio de la fase estacionaria las células se encuentran bajo un mayor estrés, por el agotamiento de nutrientes y el aumento de la concentración celular, entre otras causas, lo que favorece la producción de sustancias que le permitan prevalecer en condiciones adversas.

Aparentemente la producción de la actividad antibacteriana es diferente para cada cepa, puesto que no se observa un comportamiento similar, por ejemplo, en una cepa de *E. faecalis* (Cepa G) se produjo inhibición a las 6 h de su cinética de crecimiento contra ambos microorganismos indicadores, mientras que el sobrenadante de la cepa A del mismo género y especie no tuvo efecto inhibitorio contra *E. coli* (Tabla 22). Lo anterior podría indicar que se trata de cepas diferentes.

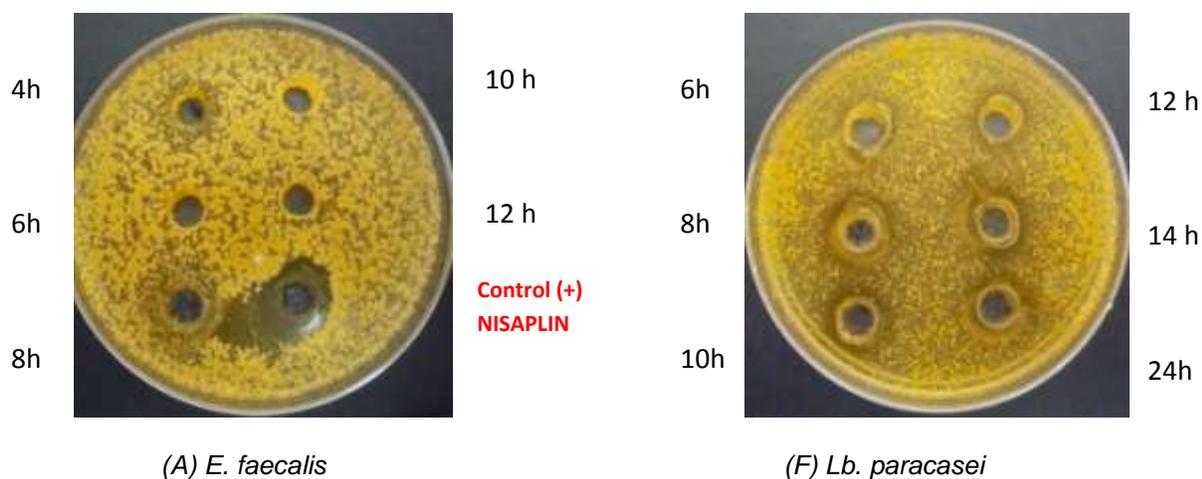
S. aureus es un microorganismo de importancia sanitaria debido a que es responsable de toxiinfecciones, particularmente en productos como los quesos salados [Dridier *et al*; 2006]. Las especies del género *Lactobacillus* que fueron aisladas del Queso Cotija, al tener un efecto inhibitorio contra este patógeno, podrían utilizarse como bioconservadores en alimentos de origen lácteo.

Con respecto al contenido de proteína (Tabla 19) se observa que la mayoría de las nueve cepas aumenta la concentración de proteína extracelular conforme a la producción de

biomasa. Para el caso de los sobrenadantes de las cepas A (*E. faecalis*), B (*E. faecium*) y C (*E. faecium*), el contenido de proteína disminuye a las 24 h de su cinética de crecimiento.

En la Tabla 22 se muestran las relaciones existentes entre el contenido de proteína cuantificado y el tamaño del halo de inhibición registrado en la prueba de difusión en agar. Se observa que en la fase estacionaria de crecimiento de *Lb. pentosus* es necesaria una baja concentración de proteína para obtener un efecto de inhibición contra *S. aureus*; además, esta cepa al igual que la cepa H (*Lb. brevis*) presentan halos de inhibición en 5 de los 6 tiempos analizados.

En la Figura 12 se observan las mismas placas obtenidas en la prueba presuntiva por difusión en agar que siguieron teniendo actividad inhibitoria solo que a un tiempo de incubación de 48 h usando como microorganismo indicador *S. aureus*



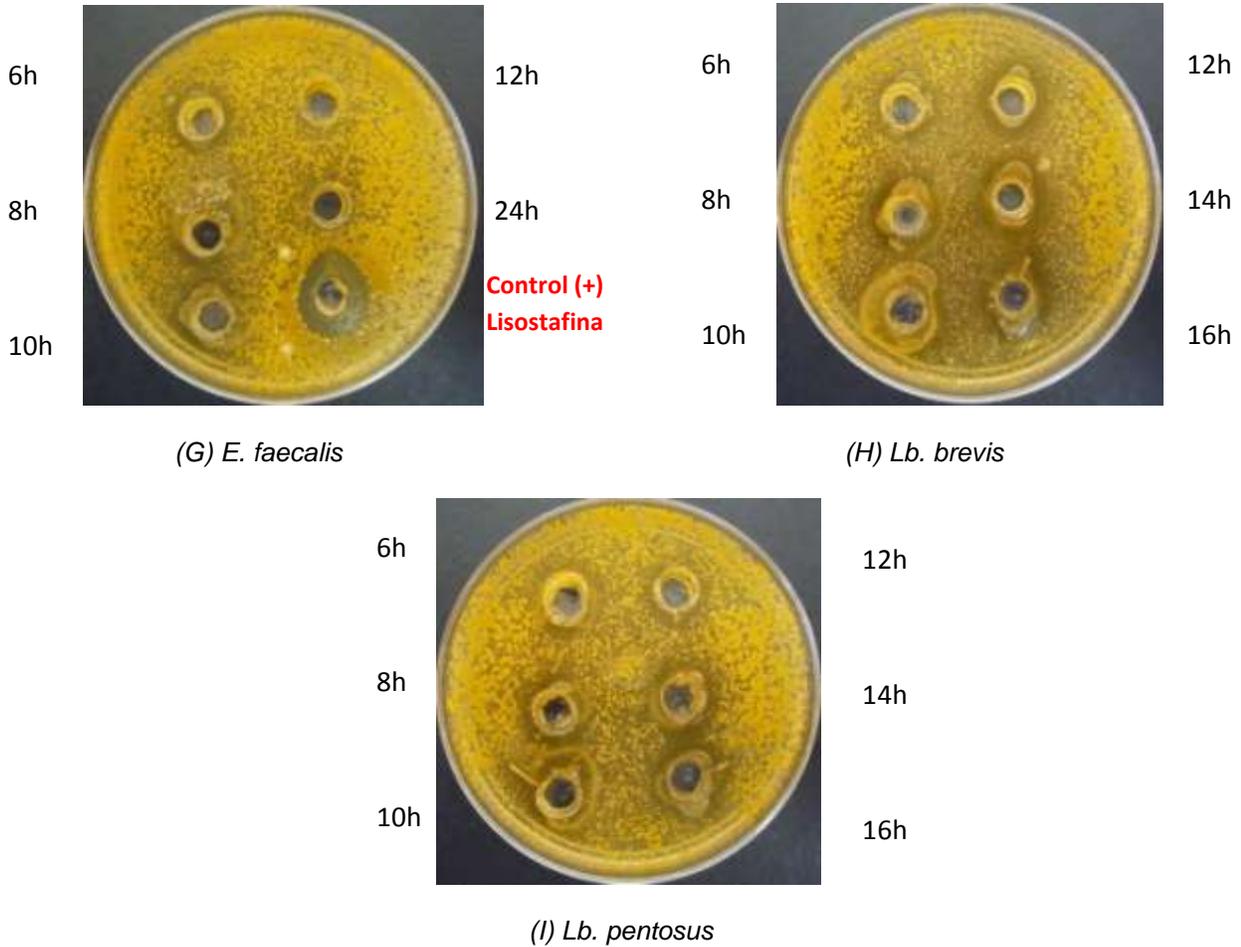


Figura 12. Prueba presuntiva de inhibición por difusión en agar. Microorganismo indicador *S. aureus*. En cada pozo se colocaron 200 μL de sobrenadante concentrado. T incubación 37°C , t de incubación 48 h.

En la Tabla 23 se resumen los diámetros de inhibición obtenidos con los sobrenadantes concentrados de los microorganismos en estudio a las 48 h de incubación utilizando como microorganismo indicador *S. aureus*

Tabla 23. Halos de inhibición* registrados de las cepas en estudio contra el microorganismo indicador *S. aureus* a las 48 h de incubación.

| Tiempo (h) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 24 |
|--------------------------|------|------|------|------|------|------|-----|------|
| (A) <i>E. faecalis</i> | 1 mm | - | 2mm | - | - | | | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | | 1 mm | 2 mm | 2 mm | 2 mm | 2 mm | | 2 mm |
| (G) <i>E. faecalis</i> | | 1mm | - | 1mm | - | | | 1 mm |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | | - | 1 mm | - | 1 mm | 2 mm | 2mm | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | | 1 mm | 2 mm | 1 mm | 1 mm | 1 mm | 2mm | |

*NOTA: Al halo de inhibición reportado se le restó el diámetro del penicilindro con el cual se formaron los pozos. No se determinó. [-] Indica que no hubo inhibición.

En la Tabla 24 se resume la relación existente entre el tamaño de los halos de inhibición obtenidos a las 48 h de incubación en la prueba presuntiva por difusión en agar y la concentración de proteína según el método de Bradford.

Tabla 24. Actividad específica [mm/mg proteína] de las cepas en estudio contra el microorganismo indicador *S. aureus* a las 48 h de incubación

| Tiempo (h) | 4 | 6 | 8 | 10 | 12 | 14 | 16 | 24 |
|--------------------------|---|---|----|----|----|----|----|----|
| (A) <i>E. faecalis</i> | 8 | - | 12 | - | - | | | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | | 5 | 12 | 9 | 17 | 12 | | 11 |
| (G) <i>E. faecalis</i> | | 8 | - | - | - | | | 4 |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | | - | 5 | - | 4 | 8 | 8 | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | | 5 | 9 | 5 | 16 | 5 | 10 | |

No se determinó. [-] Indica que no se determinó.

Para el caso de los sobrenadantes de las cepas del género *Enterococcus* especie *faecalis* (cepas A y G), siguen presentando inhibición contra *S. aureus*. A las 48 h de incubación es más fácil distinguir el halo de inhibición ya que hay un mayor crecimiento del microorganismo indicador y el césped bacteriano sigue siendo uniforme; es por esto que se pueden confirmar los tiempos en los cuales hubo inhibición a las 24 h de incubación y también se puede observar actividad en otros tiempos de cosecha, tal es el caso del

sobrenadante de la cepa A (*E. faecalis*) en la que se confirmó la actividad inhibitoria contra *S. aureus* a las 4 h de cosecha, además se observó actividad a las 8 h de cosecha y no a las 24 h de incubación. Resulta interesante que se haya encontrado inhibición en algunos sobrenadantes sobre *E. coli*. En general se considera que las Bacteriocinas tienen efecto sobre bacterias Gram (+), sin embargo, se ha demostrado que algunas bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas tales como *Lactobacillus plantarum* [Messi *et al*;2001], *Lactobacillus pentosus* [Todorov & Dicks, 2004], *Lactobacillus paracasei* [Caridi, 2002] y *Enterococcus faecalis* [Abrionel *et al*, 2001] son activas contra bacterias Gram negativas. Tomando en cuenta los resultados obtenidos se puede sugerir que la actividad antibacteriana puede relacionarse a la producción de bacteriocinas

5. Prueba turbidimétrica en microplaca

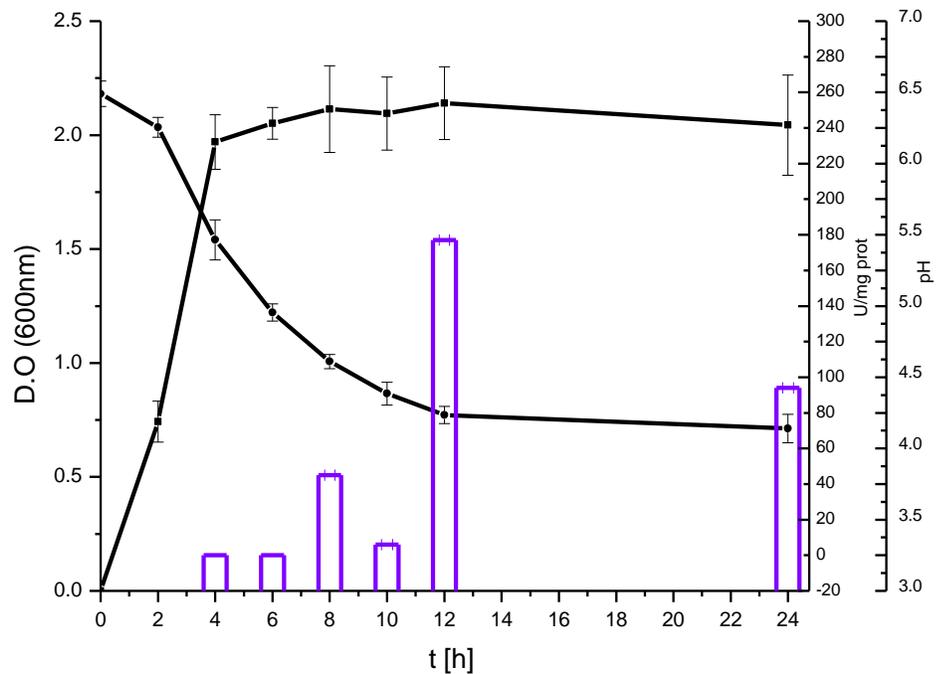
Para realizar un análisis cuantitativo se utilizó la técnica turbidimétrica en microplaca la cual se basa en experimentos realizados por Lee y Yang en el 2002. Se midió la disminución de la absorbancia ($\lambda=595\text{nm}$) con respecto al tiempo debido a la lisis del microorganismo indicador. Se realizaron diversos controles positivos con la finalidad de observar el orden en el que el decaimiento en la absorbancia se esperaría, además se utilizaron sustratos específicos para los microorganismos indicadores como lo es la lisostafina y Nisaplin® para *S.aureus*. En la Tabla 25 se resumen los resultados de actividad específica de los antibacterianos utilizados como control. La actividad específica se definió como la cantidad de enzima que provoca el decaimiento en la absorbancia de 0.001/min (U) y el contenido total de proteína de las muestras estudiadas (Lee and Yang, 2002).

Tabla 25 Actividad específica de diversos compuestos antibacterianos. Microorganismo indicador, *S. aureus*

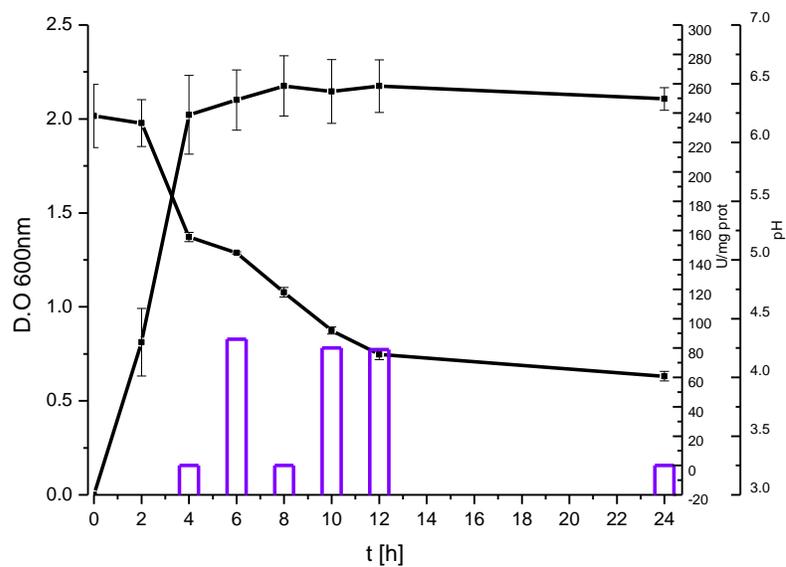
| Controles | Pendientes | Actividad específica (U/mg prot) |
|-------------|------------|----------------------------------|
| lisozima | -0.03 | 600 |
| Nisaplin | -0.048 | 960 |
| Lisostafina | -0.1557 | 3144 |

Una vez verificado el método con los controles se analizaron los 9 microorganismos en estudio mediante la técnica turbidimétrica en microplaca. En las Figuras 13 y 14 se muestran los resultados obtenidos de la actividad específica (gráfica de barras) utilizando como microorganismo indicador *S. aureus* (Figura 13) y *E. coli* (Figura 14).

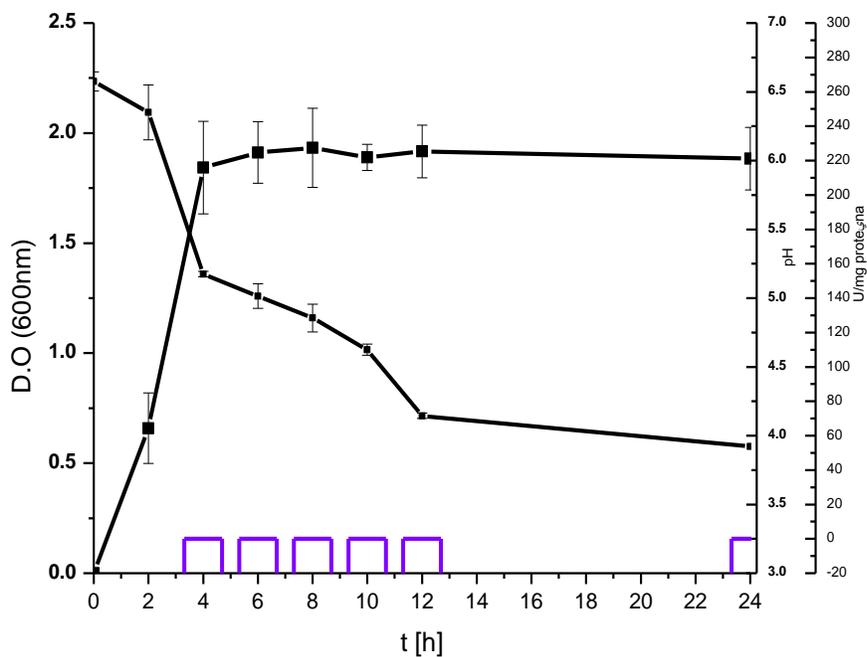
(A) *E. faecalis*



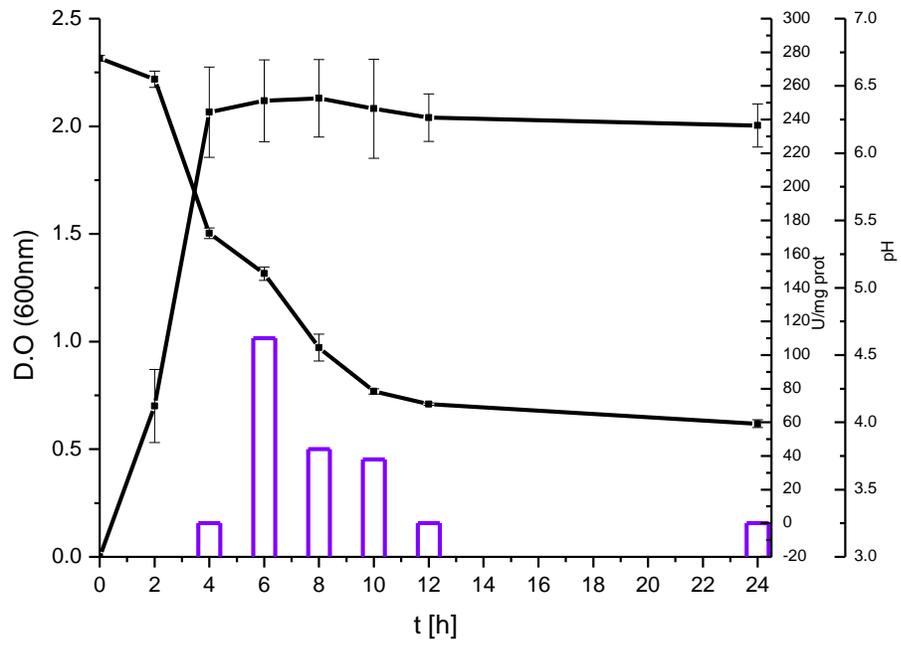
(B) *E. faecium*



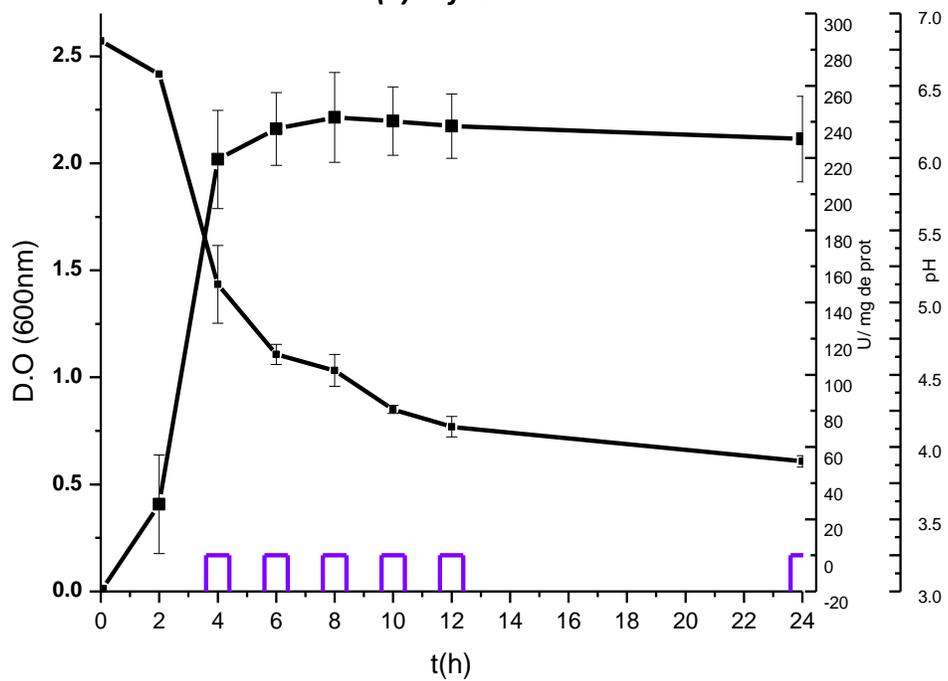
(C) *E. faecium*



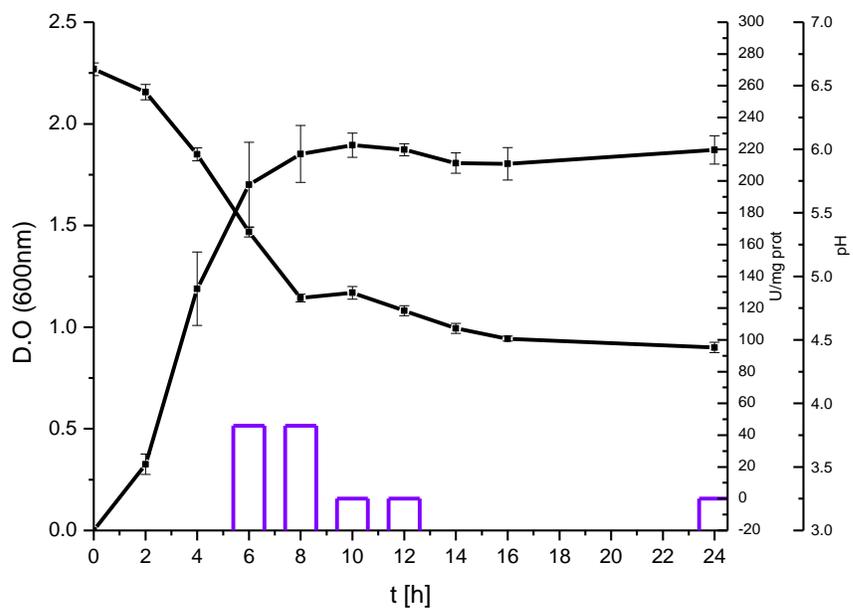
(D) *E. faecalis*



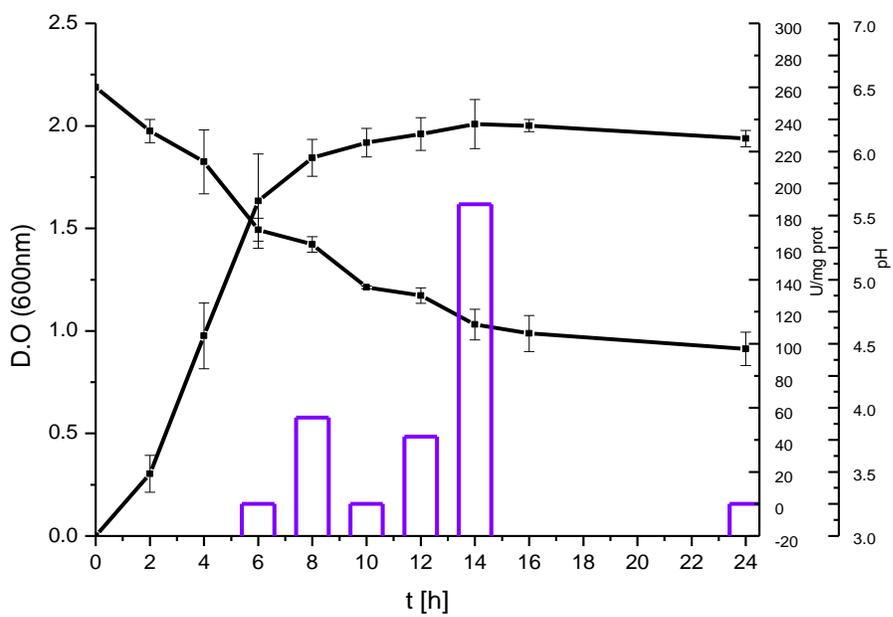
(E) *E. faecium*



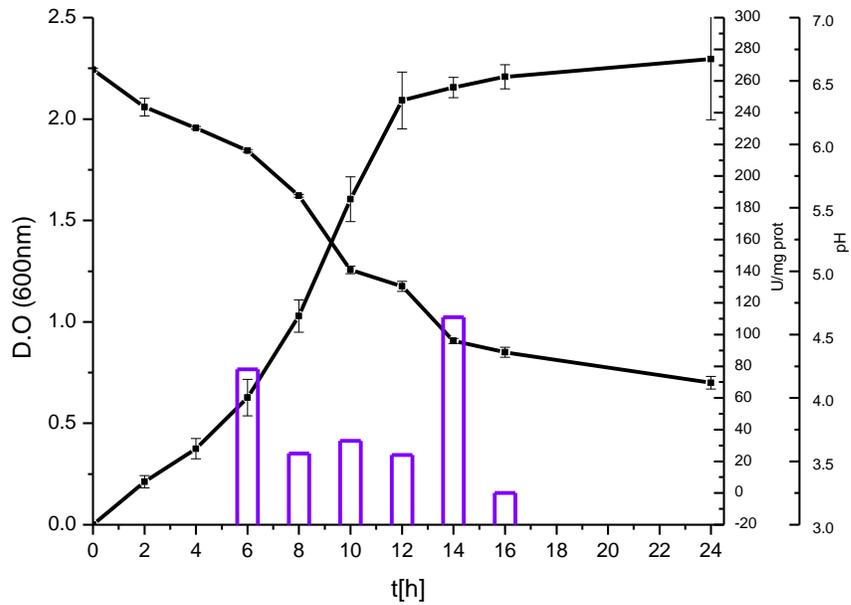
(F) *Lb. paracasei*



(G) *E. faecalis*



(H) *Lb. brevis*



(I) *Lb. pentosus*

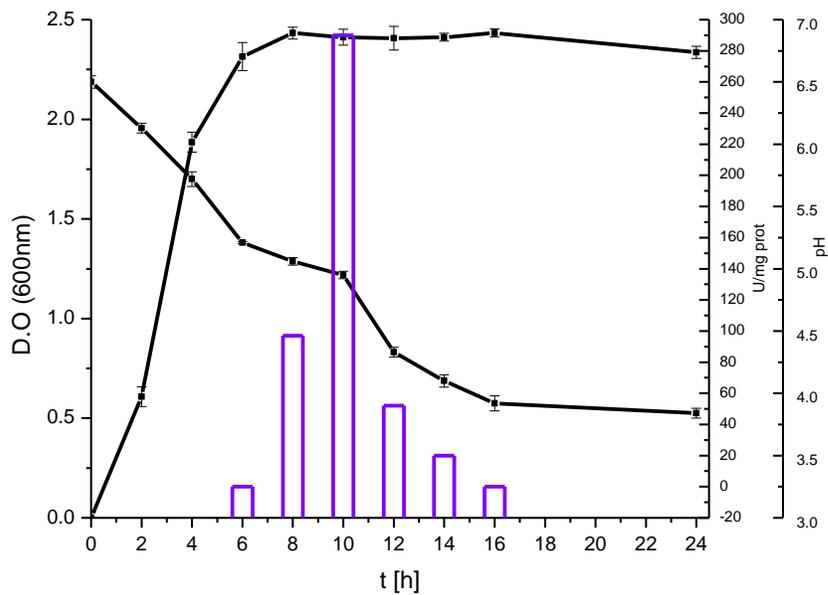
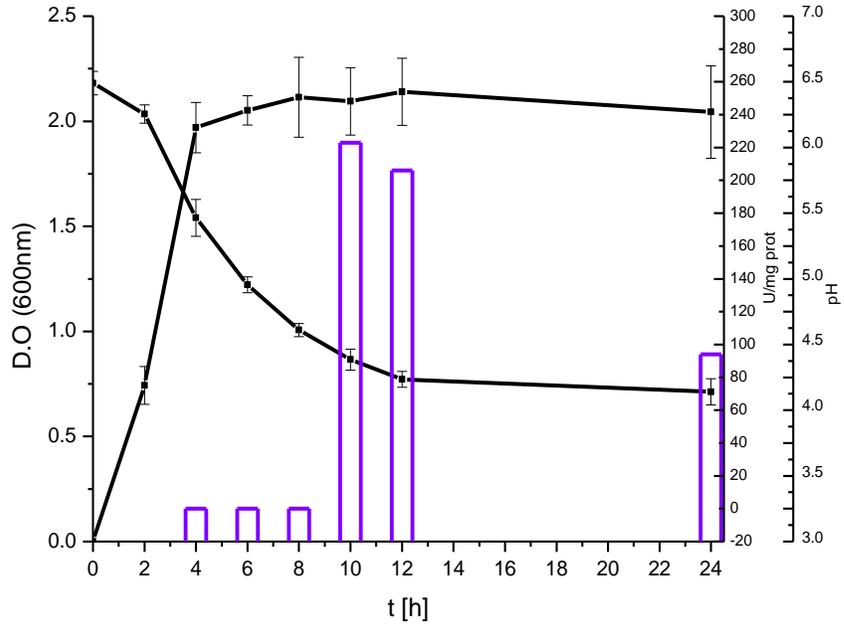
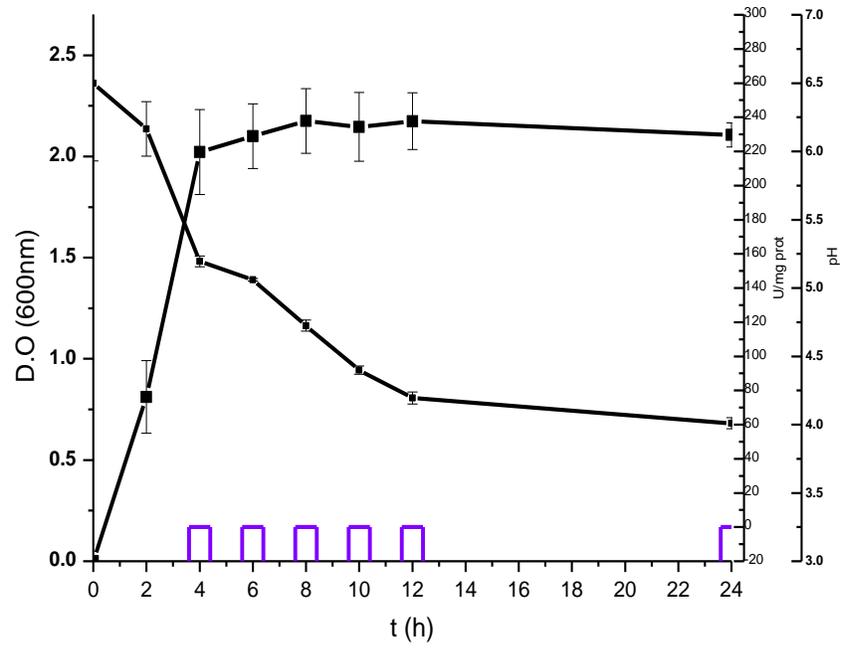


Figura 13. Actividad específica de los microorganismos en estudio mediante la técnica en microplaca. Microorganismo indicador *S. aureus*.

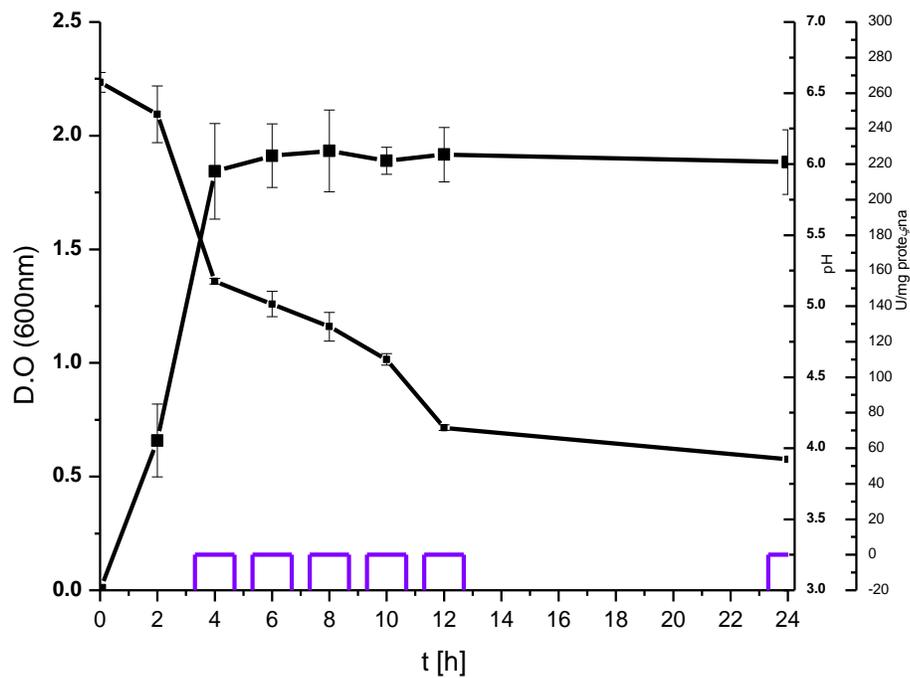
(A) *E. faecalis*



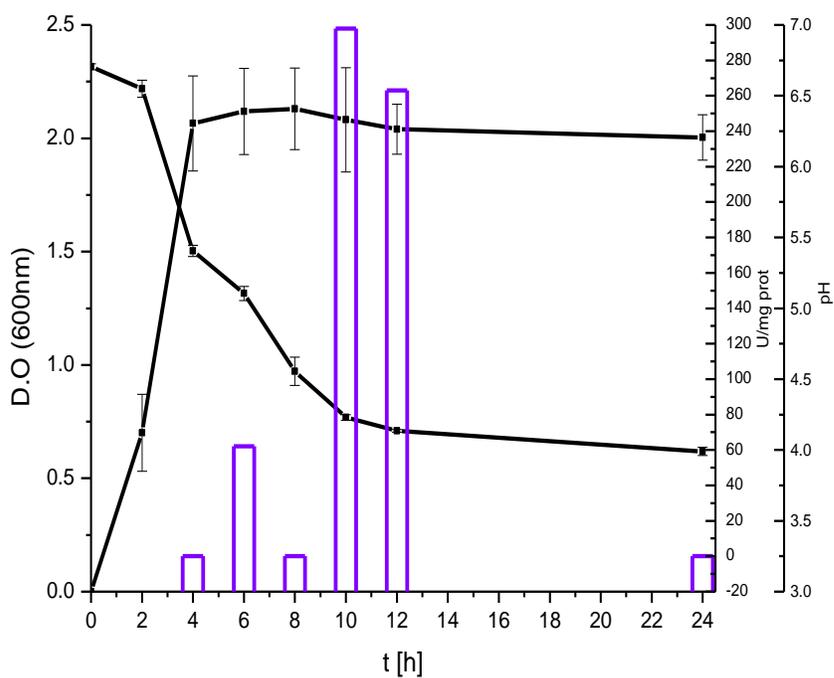
(B) *E. faecium*



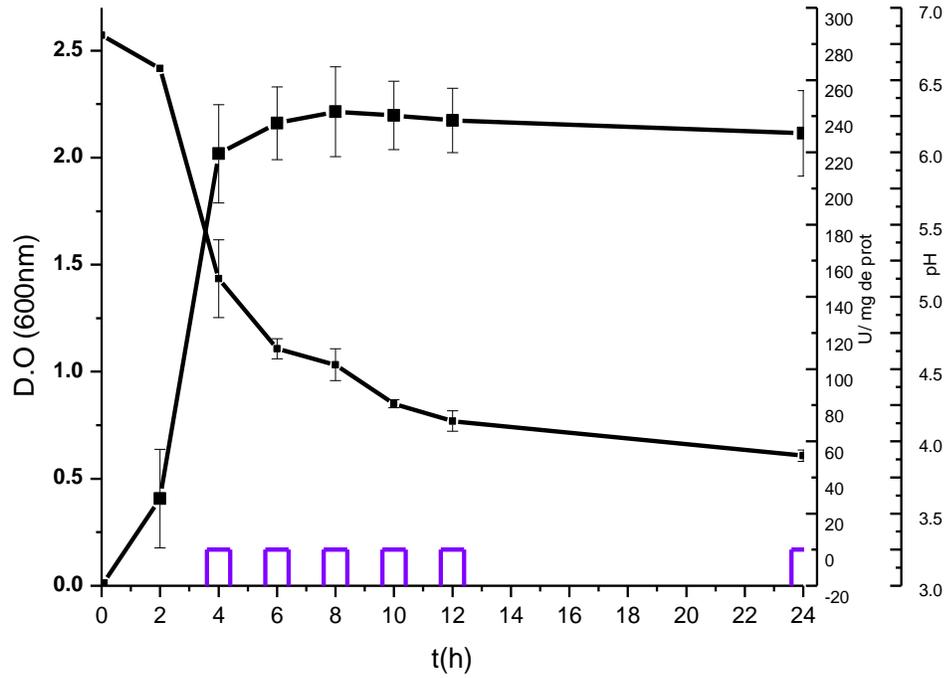
(C) *E. faecium*



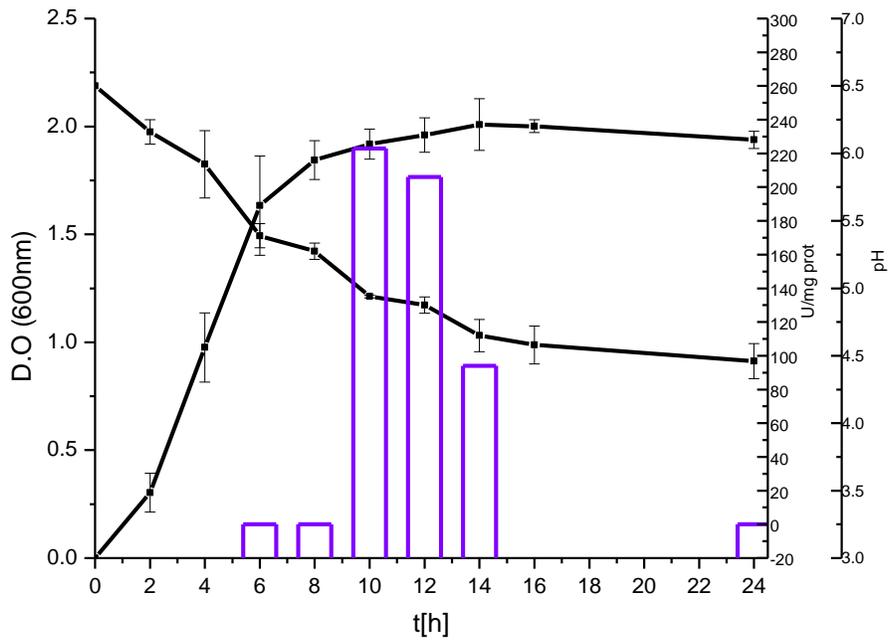
(D) *E. faecalis*



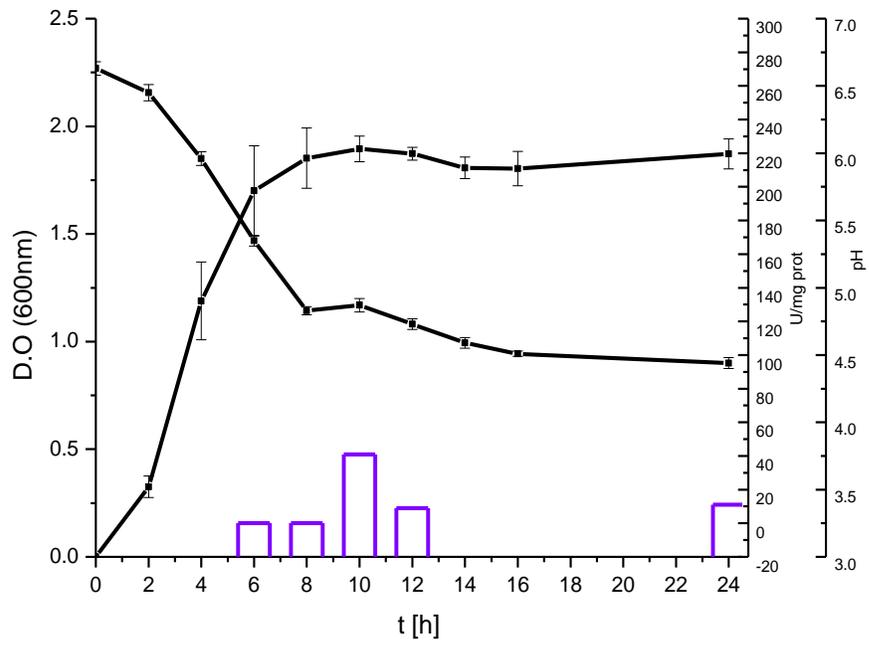
(E) *E. faecium*



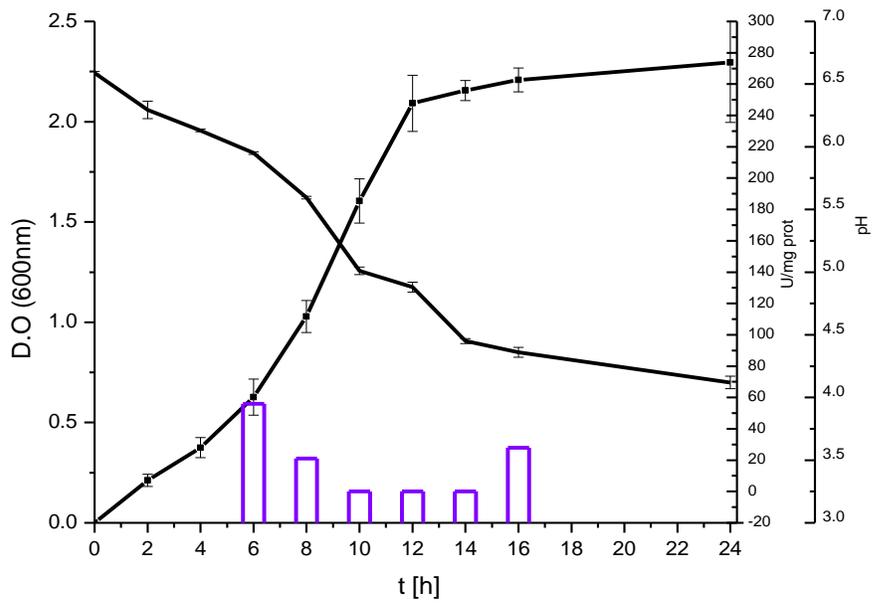
(F) *Lb. paracasei*



(G) *E. faecalis*



(H) *Lb. brevis*



(I) *Lb. pentosus*

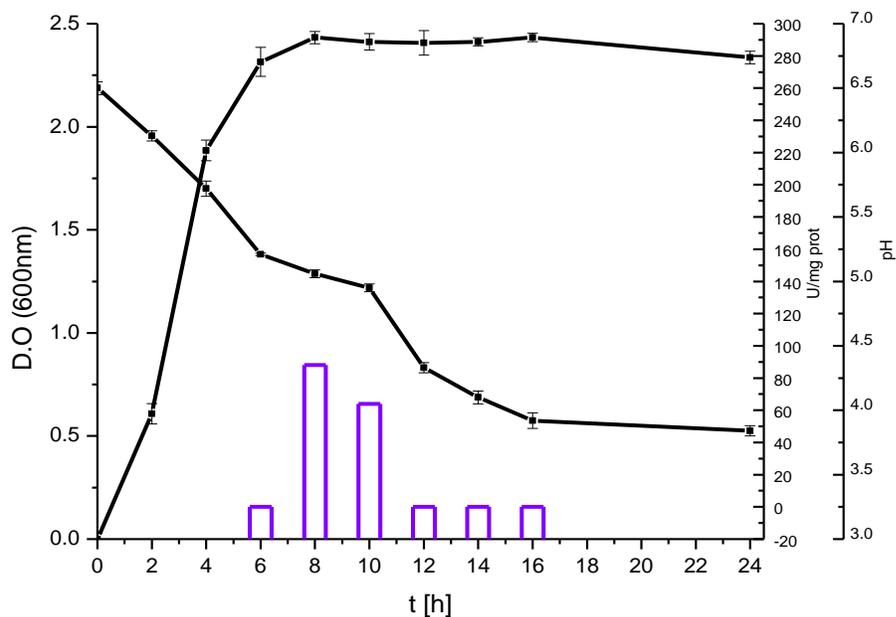


Figura 14. Actividad específica de los microorganismos en estudio mediante la técnica en microplaca. Microorganismo indicador *E. coli*.

En la Tabla 26 se resume la actividad específica obtenida por las cepas que provocaron un decaimiento en la absorbancia de los microorganismos indicadores empleados.

Tabla 26 Actividad específica [U/mg proteína] de las cepas en estudio sobre los microorganismos indicadores *S.aureus* y *E.coli*.

| Tiempo (h) | 4 | | 6 | | 8 | | 10 | | 12 | | 14 | | 16 | | 24 | |
|---------------------------|---|---|-----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|
| *Microorganismo indicador | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B | A | B |
| (A) <i>E. faecalis</i> | - | - | - | - | 50 | - | - | 220 | 177 | 200 | | | | | 94 | 92 |
| (B) <i>E. faecium</i> | - | - | 86 | - | - | - | 80 | - | 79 | - | | | | | - | - |
| (C) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | - | - |
| (D) <i>E. faecalis</i> | - | - | 110 | 62 | 44 | - | 38 | 298 | - | 263 | | | | | - | - |
| (E) <i>E. faecium</i> | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | | | | | - | - |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | | | 46 | - | 54 | - | - | 223 | - | 206 | - | 94 | | | - | 61 |
| (G) <i>E. faecalis</i> | | | - | - | 56 | - | - | 41 | 42 | 9 | 187 | - | | | - | 11 |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | | | 78 | 60 | 25 | 25 | 33 | - | 24 | - | 111 | - | - | 28 | | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | | | - | - | 97 | 88 | 297 | 64 | 52 | - | 20 | - | - | - | | |

*NOTA: **A** representa a *S.aureus* y **B** representa a *E. coli*. No se determinó. [-] Indica que no hubo inhibición.

Dentro de los resultados obtenidos se observó que este método es más sensible que lo observado por difusión en agar, general se detectó mayor actividad antibacteriana (Figuras 13 y 14).

Al igual que la prueba presuntiva por difusión en agar el sobrenadante de la cepa que tuvo mayor actividad fue *Lactobacillus pentosus* (cepa I) usando como microorganismo indicador *S.aureus* las 10 h de crecimiento. Para el caso del microorganismo indicador *E.coli*, el sobrenadante de la cepa que tuvo mayor actividad antibacteriana utilizando esta misma técnica fue *Enterococcus faecalis* (cepa D) también a las 10 h de crecimiento (298 U/mg prot).

6. Determinación del efecto inhibitorio del compuesto antibacteriano sobre un microorganismo indicador

De acuerdo a los resultados obtenidos por el método presuntivo por difusión en agar y el método turbidimétrico en microplaca se decidió trabajar con los sobrenadantes de las cepas que presentaron mayor actividad antibacteriana en el tiempo en el que ésta fue su mayor. Las cepas que se utilizaron para determinar el efecto bactericida fueron las siguientes:

- ❖ *Enterococcus faecalis* (cepa G)
- ❖ *Lactobacillus paracasei* (cepa F)
- ❖ *Lactobacillus brevis* (cepa H)
- ❖ *Lactobacillus pentosus* (cepa I)

Se realizaron curvas de crecimiento de los microorganismos indicadores en caldo BHI para *S. aureus* y caldo Luria para *E. coli*. En la figura 16 se observa las cinéticas de crecimiento de los microorganismos indicadores.

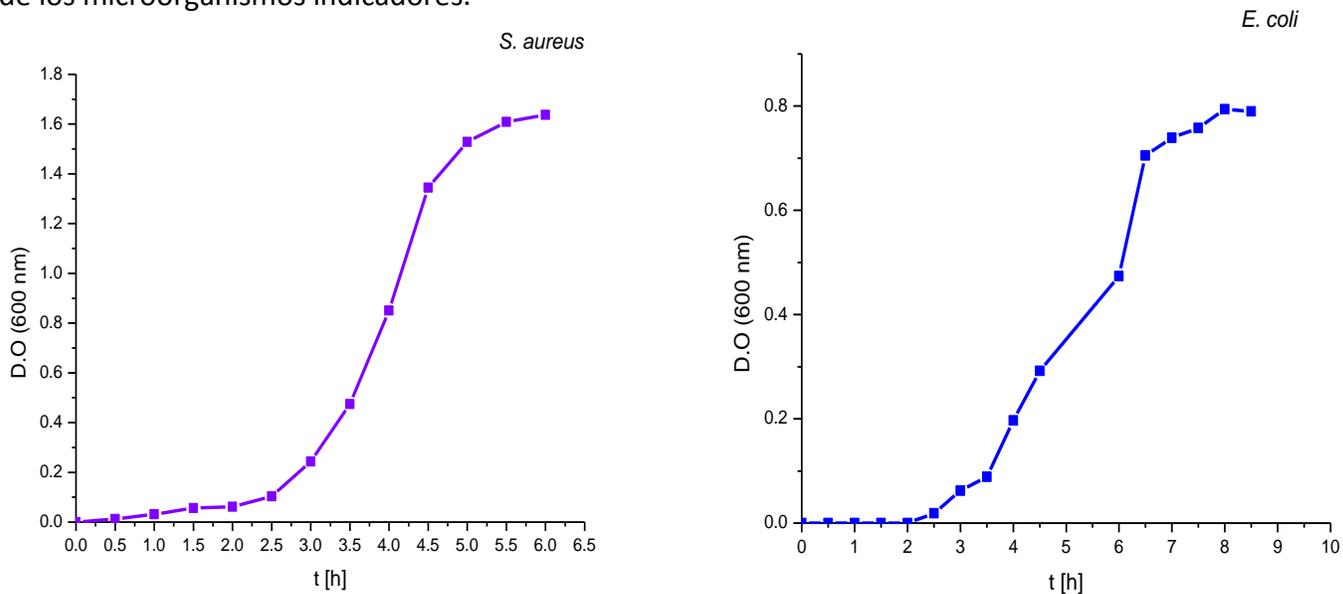
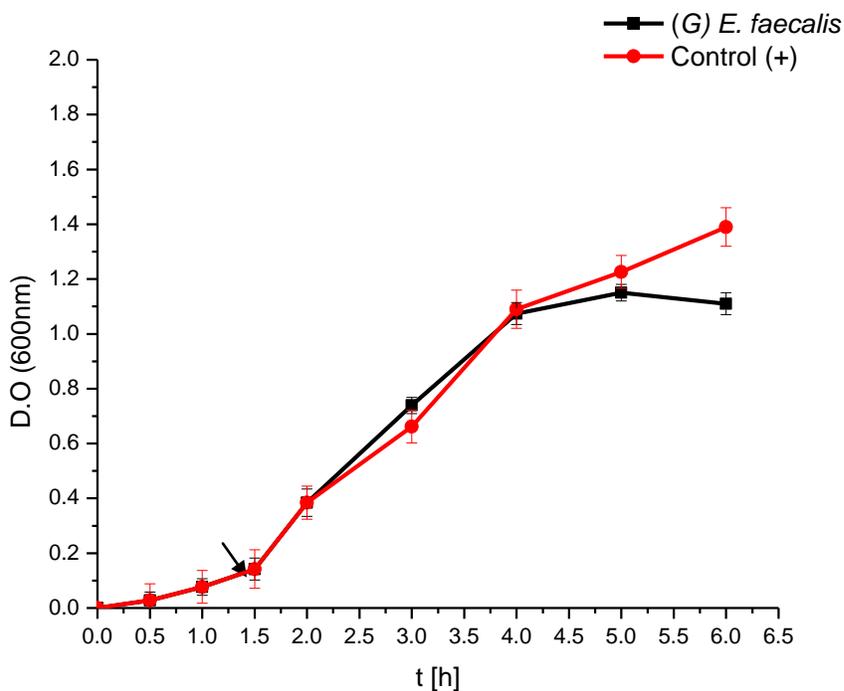
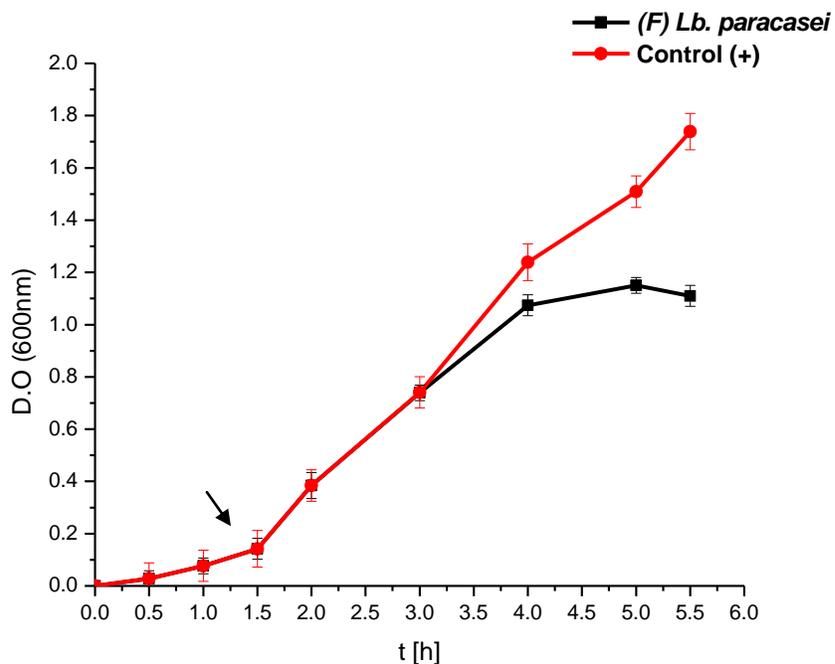


Figura 15. Cinéticas de crecimiento de los microorganismos indicadores

Una vez realizado las cinéticas de crecimiento de los microorganismos indicadores, se adicionó 1 mg de proteína total de sobrenadante concentrado de las cepas con mayor

actividad antibacteriana, cuando el microorganismo indicador se encontraba en la fase logarítmica temprana.

En la Figura 16 se muestran las cinéticas de crecimiento de *S. aureus* y su desviación estándar (n=3) al ser adicionadas con el contenido de proteína total de las cepas establecidas. La flecha en cada gráfico indica el tiempo en el que se adicionó 1 mg de proteína total de cada una de los sobrenadantes de las cepas en estudio.



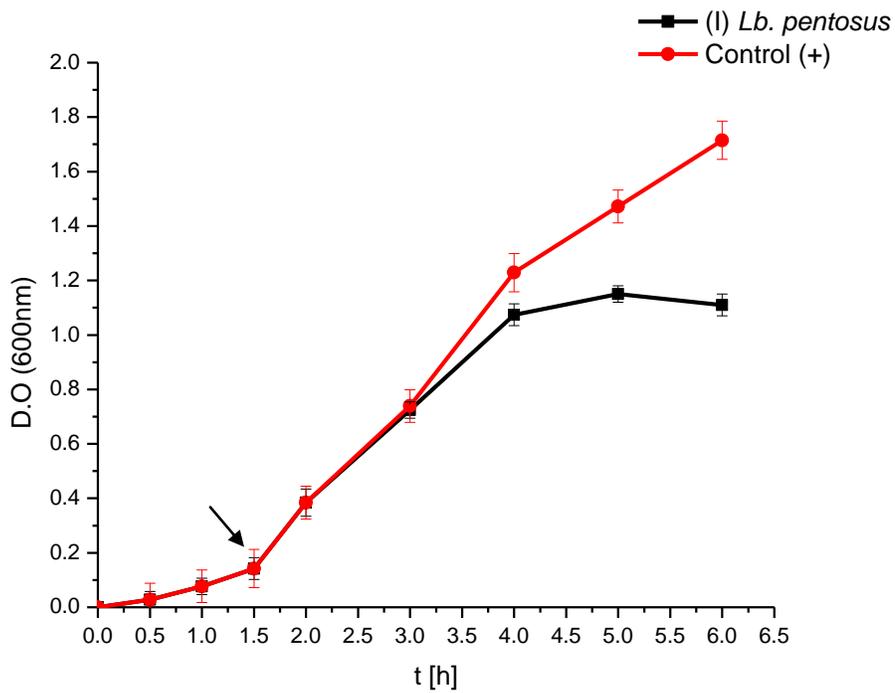
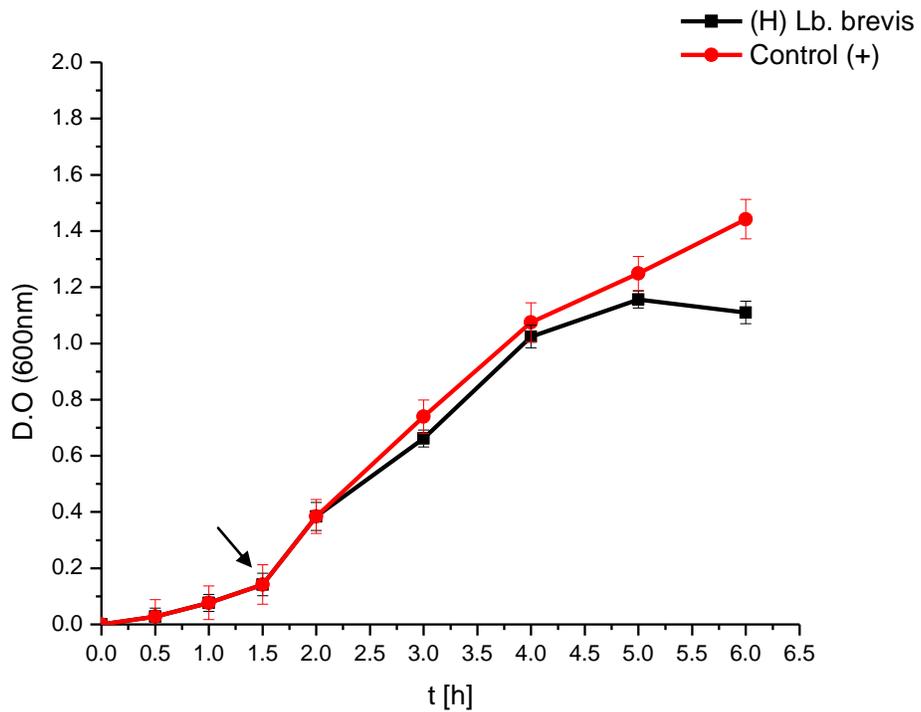
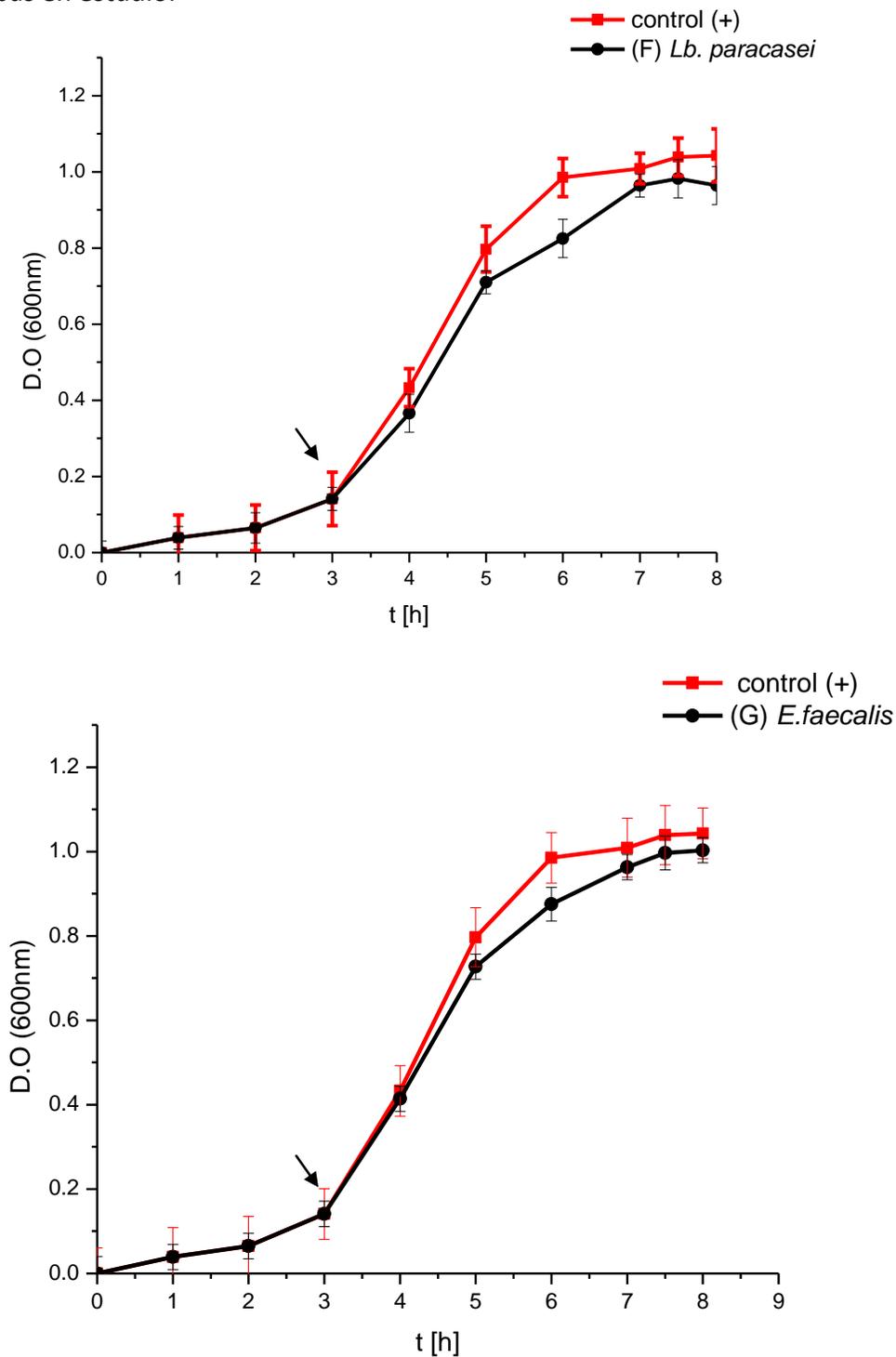


Figura 16. Efecto bactericida de las cepas en estudio sobre *S. aureus* como microorganismo indicador

En la Figura 17 se muestran las cinéticas de crecimiento y desviación estándar ($n = 3$) de *E. coli* una vez añadido 1 mg de proteína total del sobrenadante de las cepas establecidas. La flecha en cada gráfico indica el tiempo en el que se adicionó el sobrenadante de cada una de las cepas en estudio.



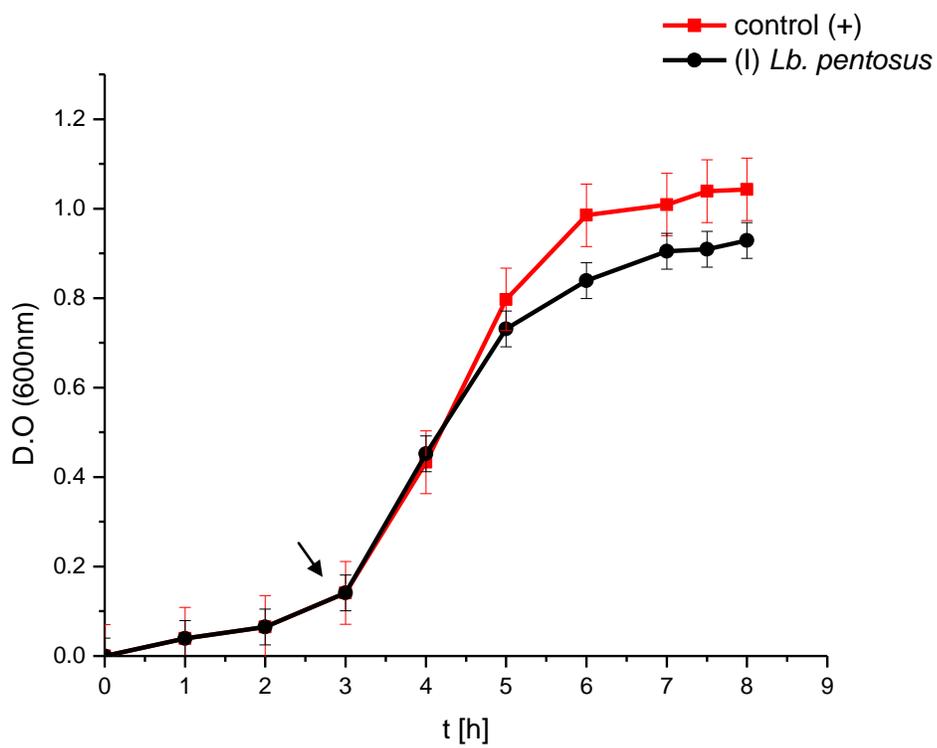
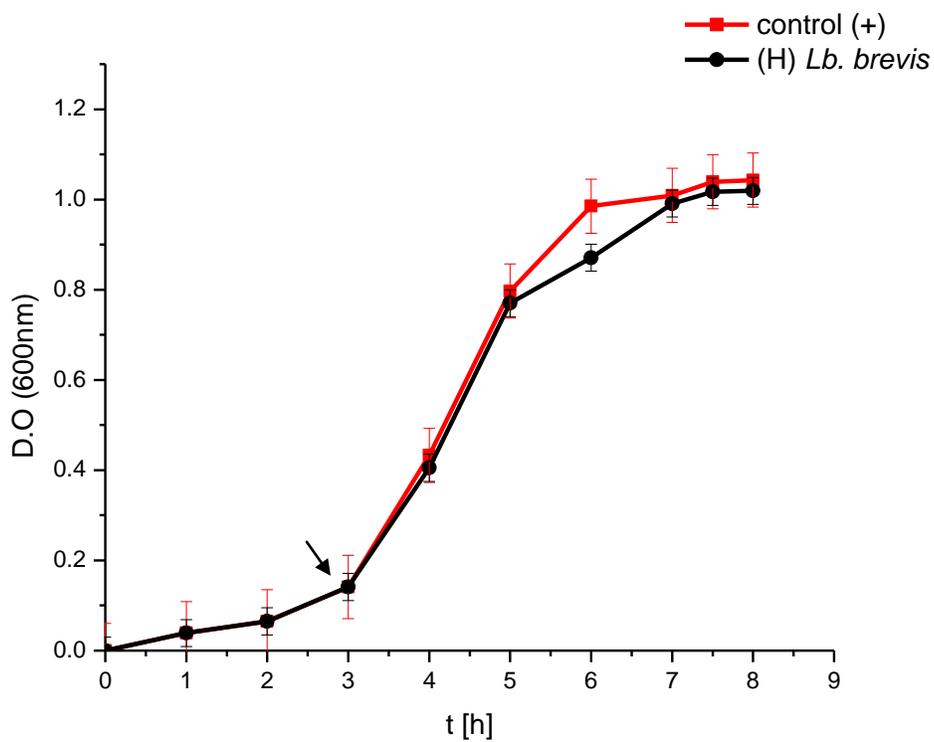


Figura 17. Efecto bactericida de las cepas en estudio sobre *E. coli* como microorganismo indicador

Se calculó el logaritmo natural de las D.O ($\lambda=600\text{nm}$) determinadas para así, obtener la velocidad de crecimiento (μ) del microorganismo indicador. En la Tabla 26 se resumen las velocidades de crecimiento (μ) de las cinéticas de los microorganismos indicadores una vez tratados con el compuesto antibacteriano.

Tabla 27. Velocidades de crecimiento de *S. aureus* y *E. coli*.

| Compuesto antibacteriano | Velocidad de crecimiento <i>S. aureus</i> [min ⁻¹] | Velocidad de crecimiento <i>S. aureus</i> Control (+) | Velocidad de crecimiento <i>E. coli</i> [min ⁻¹] | Velocidad de crecimiento <i>E. coli</i> Control (+) |
|--------------------------|--|---|--|---|
| | | 0.7152 | | 0.4932 |
| (F) <i>Lb. paracasei</i> | 0.6378 | | 0.4812 | |
| (G) <i>E. faecalis</i> | 0.6372 | | 0.4872 | |
| (H) <i>Lb. brevis</i> | 0.636 | | 0.4866 | |
| (I) <i>Lb. pentosus</i> | 0.6348 | | 0.483 | |

En la Tabla 27 se observa que las velocidades de crecimiento del microorganismo indicador *S. aureus* es menor al ser tratadas con el compuesto antibacteriano de las cepas en estudio, siendo el compuesto antibacteriano de la cepa *Lb. pentosus* (cepa I) la que ocasionó una menor velocidad de crecimiento sobre *S. aureus* lo que indica que este compuesto tuvo un mayor efecto inhibitorio, tomando en cuenta las velocidades de crecimiento obtenidas al ser tratado *S. aureus* con los compuestos antibacterianos se sugiere que el efecto es bacteriostático.

Para el caso del microorganismo indicador *E. coli* se observa que la velocidad de crecimiento disminuye al ser tratadas con el compuesto antibacteriano de las cepas en estudio. Para este caso el compuesto antibacteriano que tuvo mayor efecto inhibitorio contra *E. coli* fue el de la cepa de *E. faecalis* (cepa G). En la Figura 17 se observa la disminución de la D.O (600 nm) al igual que las velocidades de crecimiento por lo que se sugiere que el efecto de estos compuestos antibacterianos sobre *E. coli* es bacteriostático.

7) Perfil electroforético

7.1 Determinación del peso molecular en gel Tris-tricina

Se realizaron geles Tris-Tricina al 15 % en condiciones desnaturizantes. Las muestras a analizar fueron los sobrenadantes de las cepas en estudio donde hubo mayor actividad antibacteriana y el tiempo en el que fue mayor.

Para determinar el perfil de pesos moleculares, el sobrenadante fue precipitado con TCA al 20 %. Las muestras cargadas en el gel tuvieron un contenido de proteína total de 60µg suspendido en buffer PBS 100mM pH 7 y 8 µl buffer de carga. Los marcadores utilizados fueron de peso molecular ultra bajo (polypeptide, BioRad) En la Figura 18 se muestra el gel del perfil de pesos moleculares de las muestras analizadas.

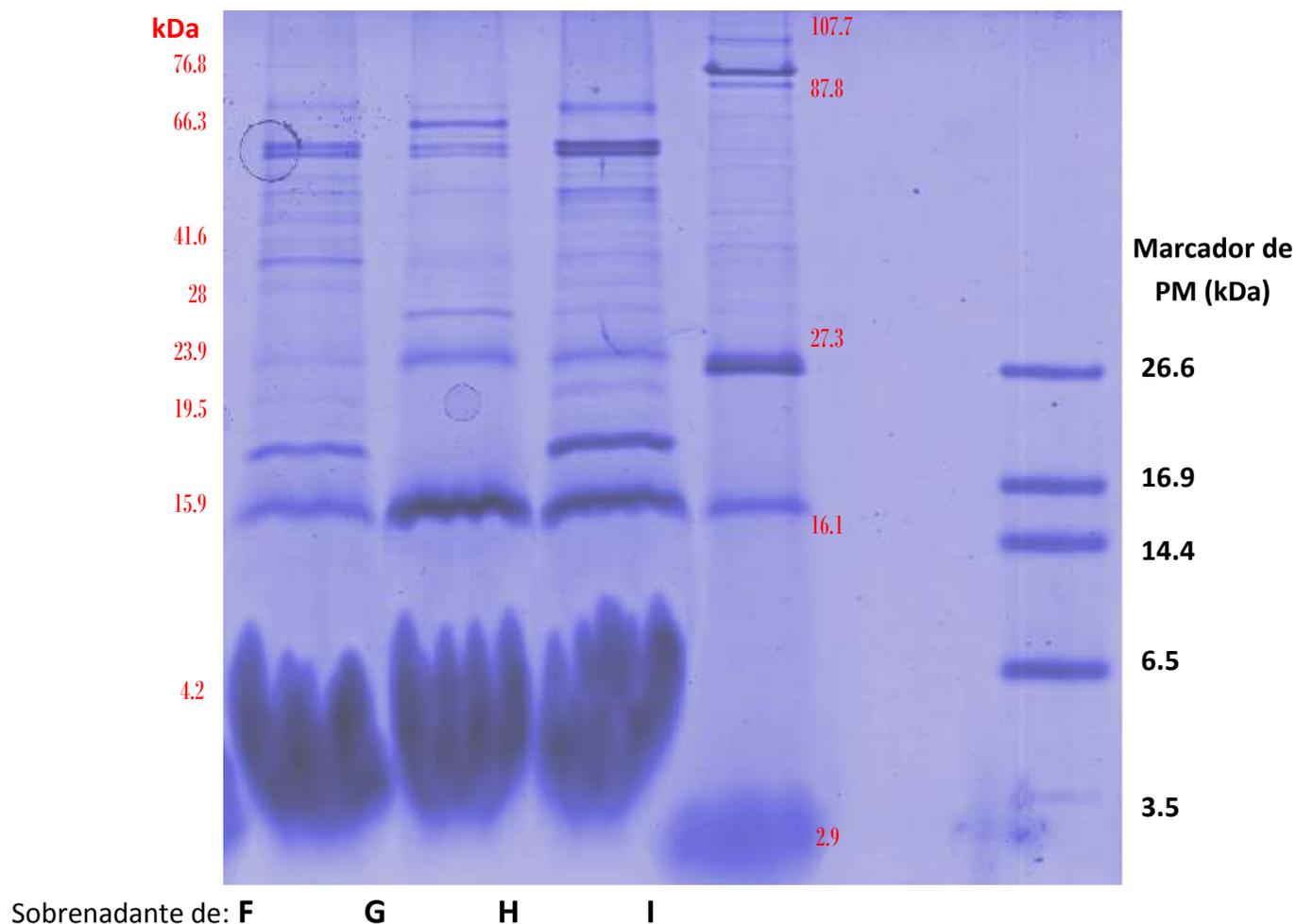


Figura 18. Perfil de pesos moleculares en gel Tris-Tricina al 15%

En la Figura 18 se observa que las 4 cepas analizadas poseen proteínas de bajo peso molecular que van desde 30 kDa hasta proteínas menores de 3.5 kDa. Para el caso de la cepa F que corresponde a *Lactobacillus paracasei* se observan tres bandas, las cuales una tiene un peso molecular mayor a 27 kDa y las otras dos bandas tienen un peso molecular de alrededor de 17 y 15 kDa respectivamente.

Para el caso de la cepa G que corresponde a *Enterococcus faecalis* se observan 5 bandas que van de un peso molecular mayor a 70 kDa hasta proteínas menores a 3.5 kDa.

La cepa H que corresponde a *Lactobacillus brevis* presenta cinco bandas que también tienen un peso molecular similar a las cepas anteriores y en el caso de la banda presente en 15 kDa, igual a la que se encuentra en las cepas F y G.

Para el caso de la cepa I que corresponde a *Lactobacillus pentosus* se observan 3 bandas de las cuales una se encuentra en 26.6 kDa y la otra se encuentra en 15 kDa.

Se puede observar que las cuatro cepas presentan una banda a los 15 kDa, mientras que las cepas F y G presentan bandas significativas en 17 kDa aproximadamente. Para el caso de las cepas G, H e I se pueden observar bandas significativas en 27 kDa.

Una vez realizado el perfil de pesos moleculares se determinó que banda tenía actividad contra *S.aureus* y ver si esta banda era de bajo peso molecular.

7.2 Zimogramas

Para determinar qué banda produce actividad antibacteriana contra el microorganismo indicador *S.aureus* se realizaron zimogramas utilizando dos técnicas diferentes. Se realizaron geles de Tris-Tricina al 15% y los carriles se cargaron con 60 µg de proteína total de cada una de las muestras a analizar.

Siguiendo las metodologías descritas (pág 41-42) se analizaron los 4 microorganismos que presentaron mayor actividad antibacteriana en las pruebas de difusión en agar al igual que la prueba turbidimétrica en microplaca. En la Figura 19 se observa el gel con las muestras

analizadas colocado en caja petri con células de *S. aureus* (10^6 UFC /mL) embebidas en agar BHI y el marcador de peso molecular empleado (ultra-bajo, Bio-Rad).

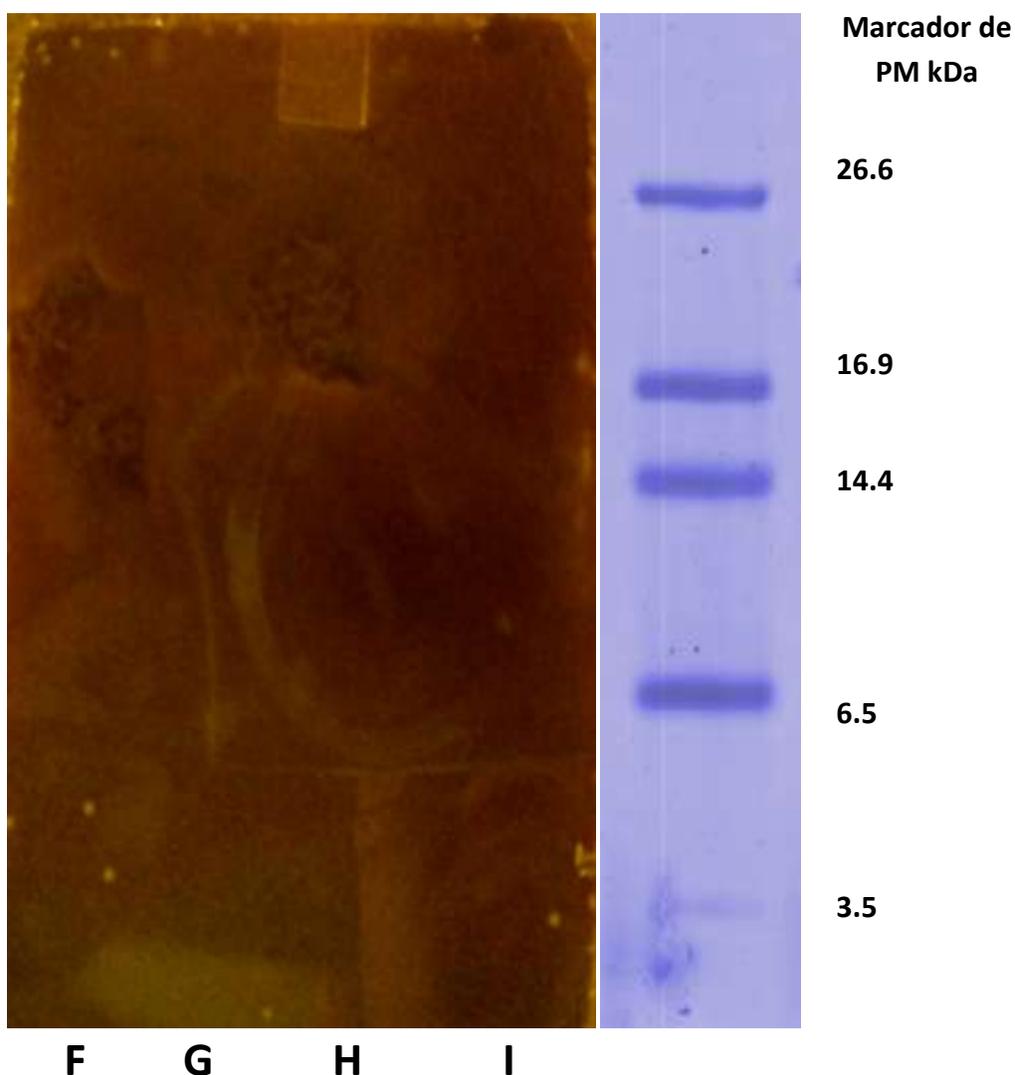


Figura 19. Zimograma empleando la técnica descrita por Bhunia et.al, 1987.

Para el caso de la técnica descrita por Bhunia *et al*; (1987) se observan manchas que indican que no hubo crecimiento del microorganismo indicador en los carriles que corresponden a las cepas F y H (*Lb. paracasei* y *Lb. brevis* respectivamente). Estas manchas de inhibición se encuentran en un peso molecular entre 25 y 14 kDa para el compuesto antibacteriano de la cepa *Lb. paracasei* (F) y 25 y 17 kDa para el caso del compuesto antibacteriano de la cepa *Lb. brevis* (H).

En la Figura 20 se observa el gel Tris-Tricina al 15% con células de *S.aureus* a una concentración de 1×10^6 UFC/mL embebidas en el gel. La actividad antibacteriana se manifiesta con la presencia de bandas no teñidas lo que demuestra que no hay células de *S. aureus* que puedan ser reveladas por la solución de azul de metileno al 0.1% y KOH al 0.01%. En la Figura 20 se observan tres bandas sin teñir alrededor de 13 kDa en los carriles que corresponden a la cepas F (*Lb. paracasei*), G (*E. faecalis*) y H (*Lb. brevis*). Estas bandas indican la presencia de actividad antibacteriana contra *S. aureus*.

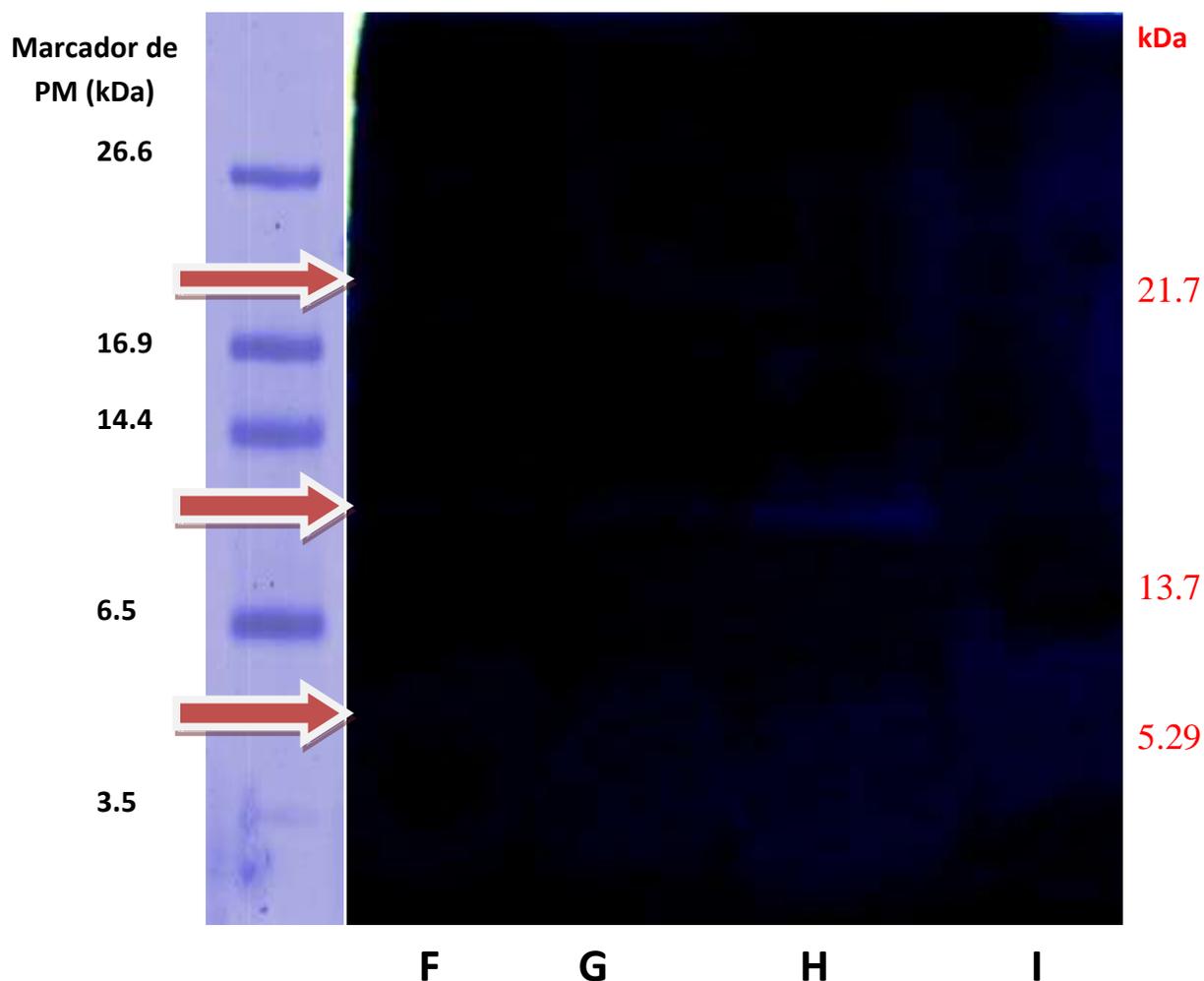


Figura 20. Zimograma en gel Tris-Tricina al 15% con células embebidas de *S. aureus*.

En el peso molecular de 20 kDa aproximadamente se observan bandas sin teñir de actividad antibacteriana en los carriles de las cepas F y G. Se puede observar la presencia

de manchas sin teñir en los carriles de las cuatro cepas en estudio con un peso molecular entre 6.5 y 3.5 kDa, lo cual indicaría la presencia de compuestos de origen proteico con bajo peso molecular y que poseen actividad antibacteriana contra *S.aureus*. *Lb. pentosus* produce una bacteriocina de peso molecular alrededor de 2-3 kDa [Okkers *et al*; 1999], en la Figura 20 se observa una mancha sin teñir entre 5 y menos de 3.5 kDa en el carril que corresponde a la cepa de *Lb. pentosus* (cepa I) por lo que se sugiere que esta inhibición pueda estar dada por una bacteriocina.

E. faecalis produce una bacteriocina de peso molecular de alrededor de 7 kDa [Maisnier-Patin *et. al*, 1996], en el carril que corresponde a la cepa *E. faecalis* (cepa G) se observa una banda sin teñir por arriba de los 6.5 kDa (Figura 20).

De acuerdo con Cotter *et al*;(2005) las bacteriocinas son péptidos de bajo peso molecular que actúan en contra de microorganismos estrechamente relacionados con la cepa productora. Los compuestos antibacterianos de las cepas en estudio presentaron un perfil de bajo peso molecular y estas bandas tienen actividad antibacteriana contra el microorganismo indicador *S. aureus*, ésta no es una bacteria estrechamente relacionada con las cepas productoras del compuesto antibacteriano (BAL) sin embargo, se ha demostrado que algunas bacteriocinas de la clase I (poseen el aminoácido lantionina) así como la nisina son capaces de aniquilar un amplio rango de microorganismos incluyendo *Aciynomyces*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Gardnerella*, *Lactococcus*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus* y *Staphylococcus* [Mota-Meira, M. *et al*; 2000].

De acuerdo a los resultados obtenidos por las dos técnicas se sugiere que el mejor método de identificación de las bandas de actividad fue el de células de *S.aureus* embebidas en el gel ya que se pueden apreciar bandas en las 4 cepas en estudio y además se observa con claridad el peso molecular de las bandas observadas.

IX. CONCLUSIONES

- 1) Las bacterias ácido lácticas aisladas del queso Cotija del género *Lactobacillus* estudiadas y una cepa del género *Enterococcus* son productoras de compuestos antibacterianos.
- 2) La mayoría de estas bacterias ácido lácticas presentan mayor actividad antibacteriana cuando se encuentran en la fase estacionaria temprana.
- 3) *Lactobacillus pentosus* es el microorganismo que presenta mayor actividad antibacteriana contra el microorganismo indicador *S. aureus*.
- 4) *Enterococcus faecalis* es quien presenta mayor actividad antibacteriana contra el microorganismo indicador *E. coli*.
- 5) El efecto de inhibición de crecimiento celular es bacteriostático.
- 6) La técnica turbidimétrica en microplaca es más sensible en comparación con la prueba presuntiva por difusión en agar y además, requiere de menos muestra para observar efecto inhibitorio contra el microorganismo indicador.
- 7) El perfil de pesos moleculares de los compuestos antibacterianos de las cepas *Lb. paracasei*, *brevis* y *pentosus* así como *E. faecalis* tiene un rango entre 107 y 3.5 kDa.
- 8) *Lactobacillus paracasei* (cepa F) presentó proteínas con actividad antibacteriana contra *S. aureus* a 20, 11, 5 Y 3.5 kDa aproximadamente.
- 9) *Enterococcus faecalis* (cepa G) presentó proteínas con actividad antibacteriana a 20, 11, 5 y 3.5 kDa.
- 10) *Lactobacillus brevis* (cepa H) presentó proteínas con actividad antibacteriana a 11, 5 y 3.5 kDa.
- 11) *Lactobacillus pentosus* (cepa I) presentó proteínas con actividad antibacteriana entre 5 y 3.5 kDa.

12) Las proteínas con actividad inhibitoria presentes en las cepas F (*Lb. paracasei*) y H (*Lb. brevis*) tiene un rango entre 25 y 14 kDa aproximadamente.

X. REFERENCIAS

- 1) **Abrionel, H., Valdivia, E., Galvez, A. and Maqueda, M.** (2001); Influence of physico-chemical factors on the oligomerization and biological activity of bacteriocin AS-48. *Curr. Microbiol.*, 42, 89–95.
- 2) **Ahn, C. Stiles, M.E.** (1990). Plasmid-associated bacteriocin production by a strain of *Carnobacterium piscicola* from meat. *Appl. Environ. Microbiology*. 228.
- 3) **Albano, H. Todorov, S. Van Reenen, C. Hogg, T. Dicks, L. Teixeira, P.** (2007) Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. *International Journal of Food Microbiology* 116: 239–247.
- 4) **Asociación Regional de Productores de queso Cotija.** (2005). *Triptico informativo*. México.
- 5) **Badui, S.** (2006). *Química de los Alimentos*, 4ta ed. Pearson Addison Wesley. México. pp. 618.
- 6) **Barajas R, Barragán E, Chombo P.** (2005). Reglas de Uso, Marca Colectiva “Queso Cotija Región de Origen”. México. Pp 1-24.
- 7) **Beresford, T., Fitzsimons, N., Brennan, N., Cogan T.** (2001). Recent advances in cheese microbiology. *International Dairy Journal* 11: 259–274,
- 8) **Bhunia A. K; Johnson M.C; Bibek R.** (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* 2. 319-322.
- 9) **Bibek R.** Food biopreservatives of microbial origin. (1992). *CRC Press*.
- 10) **Bravo, A.** (2008). Estudio de las poblaciones microbianas de interés biotecnológico aisladas del queso Cotija. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México D.F.
- 11) **Brown, M.H; Emberger, O.** (1980). Ecología Microbiana de los Alimentos. Vol. 1. *International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)*. Ed. Acribia. España.

- 12) Caridi, A.** (2002). Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 303–308.
- 13) Cayot, N.** (2007). Sensory quality of traditional foods. *Food Chemistry* **102**: 445-453.
- 14) Cleveland J., Montville, T., Nes, I., Chikindas M.** (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**: 1-20.
- 15) Cogan, T., Hill, C.** (1993). Cheese starter cultures. En *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology*, Chapman & Hall, 2ª Londres, pág. 193-255.
- 16) Curioni, P. & Bosset, J.** (2002). Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography—olfactometry. *International Dairy Journal* **12**: 959–984.
- 17) Chien, W. Li, Li, J. Shann, T.** (2005). Comparative Study on Antibacterial Effect of Pediocin ACCEL and Nisin against Fluorescencestained *Listeria monocytogenes* BCRC 14845. *Food Microbiology and Safety* **70**: 75-80.
- 18) Cotter, P. Hill, C. Ross, P.** (2005) Bacteriocins: Developing innate immunity for food. *Nature Review: Microbiology* **3**; 777-778.
- 19) Daly, C. Sandine, W.E & Elliker, P.R.** (1972). Interactions of food starter cultures and foodborne pathogens: *Streptococcus diacetylactis* versus food pathogens. *Journal of Milk Food Technology*. **35**, 349.
- 20) Daeschel, M.A** (1989). Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technology*; (43) 1,164.
- 21) 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.
- 22) Delgado, A., Arroyo, F., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., Garrido-Fernández, A.** Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology* **130**: 193-201, 2007.
- 23) De Vuyst, L.** (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Food Science and Technology* **15**. 67-78.

- 24) De Vuyst, L. and Vandame, E.** (1994). Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetics and applications. *London: Blackie Academic and Professional.*
- 25) Doyle, M., Beuchat, H., Montville, T.** (2000). Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. Acribia, España, Zaragoza, pág. 582-591.
- 26) Drider, D; Gunnar, F; Yann, H; Lynn, M; Hervé, P.** (2006). The Continuing Story of Class Ila Bacteriocins. *American Society for Microbiology.* 564-582.
- 27) Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K., Ishizaki, A.** (2000). Class Ila bacteriocins. Biosynthesis, structur and activity. *FEMS Microbiology Reviews* **24**: 85-106.
- 28) Fontana, C; Cocconcelli, P.S.** (2005) Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. *International Journal of Food Microbiology* **103**. 131-142.
- 29) Fox. F Patrick et. al** (2000). Fundamentals of Cheese Science. *Aspen Publication.* USA. 153-154. 163-164, 206-209, 236-237.
- 30) García, V.** Aislamiento de microorganismos con mayor actividad lipolítica del queso Cotija. (2007). Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, D.F.
- 31) García, G.M; Revah, S.M; Gómez, R.L.** (2004). *Productos Lácteos.* En: López-Munguía C. A et. al compiladores. Biotecnología Alimentaria. Ed. Limusa. México. Pp 179-193.
- 32) Gherna, R. & Plenta, P.** (1989). American type culture collection , in Catalogue of Bacteria and Bacteriophages, 17 th Ed. *American type culture collection, Rockville, MD.*
- 33) Giraffa, G.** (2003). Functionality of enterocci in dairy products. *International Journal of Food Microbiology* **88**: 215-222.
- 34) Hécharrd, Y., Sahl, H.** (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-postive bacteria. *Biochemie* **84**: 545-557.
- 35) Hernández, N.** (2007). Identificación de bacterias proteolíticas aisladas de queso Cotija, un estudio microbiológico y fisicoquímico. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.
- 36) Holzapfel & Stiles M.** (1997). Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiology* **36**: 1-29.
- 37) Hurst, A.** (1981). Nisin. *Ad.. Appl. Microbiol;* 27-85.

- 38) Jay, J; Loessner, M; Golden.** (2005). D. Modern Food Microbiology. 7 ed. *Food Sciences Text Series*. USA. pp 476-484.
- 39) Konings, W.N & Otto, R.** (1983). Energy transduction and solute transport in *Streptococci* *Antonie Van Leeuwenhoek* 49, 247.
- 40) Lee, Y., Yang, D.** (2002). Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry* **310**: 223-224.
- 41) Leroy, F; De Vuyst, L.** (2004). Simulation of the effect of sausage ingredients and technology n the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *International Journal of Food Microbiology* 100; 141-152.
- 42) Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Brock.** (2004). Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall, 10ª edic., Madrid, España, pag. 144-145, 399-400, 402-403, 697, 807-808.
- 43) Maina, J; Schillinger, U; Museve, P.** (2004). Isolation, identification and characterization of the dominant microorganism ok kule naoto: the Masai traditional fermented milk in Kenya. *International Journal of Food Microbiology* 94, 669-278.
- 44) 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. *Food Microbiology* **30**: 255-270.
- 45) Marilley, L; Casey, M.G.** (2004). Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *International Journal of Food Microbiology* 90. 139-159.
- 46) Mataragas, M., Drosinos, E. H., & Metaxopoulos, J.** (2003). Antagonistic activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* in sliced cooked cured pork shoulder stored under vacuum or modified atmosphere. *Food Research and Technology*, 20, 259–265.
- 47) McSweeney, P., Sousa, M.** (2000). Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: a review. *Lait* **80**: 293-324.

- 48) Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Batinni, R. and Manicardi, G.** (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. *International Journal. Food Microbiology.*, **64**, 193–198.
- Mota-Meira, M; Lapointe, G; Lacroix, C; Lavoie, M.C.** (2000). MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**:24-29.
- 49) Motlagh, A.** Antimicrobial efficiency of pediocin AcH and genetic studies of the plasmid encoding for pediocin AcH. Tesis de Doctorado. University of Wyoming, Laramie. 1991.
- 50) Okkers, D., Dicks, L., Silvester, M., Joubert, J., Odendaal, H.** (1999). Characterization of pentocin TV35b, a bacteriocin-like peptide isolated from *Lactobacillus pentosus* with a fungistatic effect on *Candida albicans*. *Journal of Applied Microbiology* **87**: 726–734
- 51) Pelaéz, C. & Requena T.** (2005). Exploiting the potential of bacteria in the cheese ecosystem. *International Dairy Journal* **15**: 831–844.
- 52) Rammelsberg, M. & Radler, F.** (1990) Antibacterial polypeptide of *Lactobacillus spp.* *Journal Appl. Bacteriol.* 69-177.
- 53) Rammelsberg, M. Muller, E. Radler, F.** (1990). Caseicin 80: purification and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus casei*. *Arch. Microbiology*; 154-249.
- 54) Riley, M., Wertz, J.** (2002). Bacteriocins: evolution, ecology and application. *Annu. Rev. Microbiology* **56**:117-137.
- 55) Rekhif, N., Atrih, A. & Lefebvre, G.** (1994). Selection and properties of spontaneous mutants of *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 resistant to different bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Curr. Microbiol.* **28**: 237-241.
- 56) Rodríguez, E., Calzada, J., Arqués, J., Rodríguez, 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.

- 57) Rozbeh, M.** (1990) Extension of Shelf-life in Vacuum-Packaged Fresh Beef. M. S thesis. University of Wyoming, Laramie.
- 58) Saavedra, L., Taranto, M., Sesma, F., Font de Valdez, G.** (2003). Homemade traditional cheeses for the isolation of probiotic *Enterococcus faecium* strains. *International Journal of Microbiology* **88**: 241-245.
- 59) Salminen, S; Wright, A. V.** (1998). Lactic Acid Bacteria. Microbial and functional aspects. 2da. Ed. Marcel Dekker, Inc. USA.
- 56) Schägger, H and Von J.G.** (1987). Tricine- Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**. 368-379.
- 60) Sneath, P.H.A** (1986). Ed. Bergey's Manual of Systemic Bacteriology, Sections 12, 14, 15 Vol. 2. Williams & Wilkins, Baltimore.
- 61) Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T.** (2004). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour. *World Journal of Microbiology. and Biotechnology.*, **20**, 643–650.
- 62) Todorov, S., Dicks, L.** (2006). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria. Comparison of the bacteriocins. *Process Biochemistry* **41**: 11-19.
- 63) 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.
- 64) Villegas. A.** (2004). Tecnología quesera. Capítulo 13. Fichas técnicas. Edit. Trillas . México, D.F. pp 316-321.
- 65) Vlaemyneck, G., Herman, L. & Coudijzer K.** (1994). Isolation and characterization of two bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* strains inhibitory to *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Microbiology* **24**: 211-225.
- 66) Weinrichter, B., Luginbuhl, W., Rohm, H., Jimeno, J.** (2001). Differentiation of facultatively heterofermentative lactobacilli from plants, milk, and hard type cheeses by

SDS-PAGE, RAPD, FTIR, energy source utilization and autolysis type. *Food Science and Technology* **34**: 556– 566.

67) Zuñiga, B. (2009). Descripción e identificación de la comunidad bacteriana presente en el Cotija por métodos moleculares. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química. UNAM, México, D.F.

Normas consultadas:

68) NOM-121-SSA1-1994. QUESOS: FRESCOS, MADURADOS Y PROCESADOS.