



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Producción masiva de sustancias similares a
bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus* spp. en
medios de cultivo no convencionales. Nivel de matraz.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A:

SALVADOR SAMANO MUÑOZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Q. F. B. Aurora Irma Ortegón Ávila

VOCAL: Dra. Gloria Díaz Ruíz

SECRETARIO: Q. A. Aleida Mina Cetina

1er. SUPLENTE: Dr. Oscar Hernández Meléndez

2° SUPLENTE: Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Gloria Díaz Ruíz

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

SUSTENTANTE:

Salvador Samano Muñoz

RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT de la UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN223917 “Combinando la morfología y la bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Gloria Díaz Ruíz**, por haberme aceptado desde un inicio para formar parte de su grupo de trabajo desde el servicio social, pasando por la estancia estudiantil y ahora culminar mi estancia con la realización de esta tesis. Gracias por el tiempo, confianza y apoyo, y sobre todo gracias por formar parte de este logro profesional; fue muy grato estar bajo su asesoría.

A la **Dra. Carmen Wachter Rodarte** por las observaciones, revisión de este escrito y por pertenecer a su grupo de trabajo.

Un especial agradecimiento a la **Dra. Rebeca Ramírez Carrillo** por su ayuda y orientación para realizar el análisis estadístico, por tomarse el tiempo y facilitarme el acceso al programa SPSS.

Gracias a las profesoras **Aleida Mina Cetina** y **Aurora Ortegón Ávila**, que conforman mi jurado de examen, por sus revisiones y recomendaciones hechas para mejorar la presentación de este trabajo.

Agradezco a mis profesores de todos los niveles educativos por los cuales he cursado, ya que por sus contribuciones, conocimientos transmitidos y dedicación me encuentro en la finalización de mis estudios de licenciatura.

A mis compañeros del laboratorio 324, por haber hecho mis horas de trabajo más llevaderas y en especial a aquellos con quien compartí alegrías y risas en esas largas jornadas de trabajo que nos tocaba estar juntos.

Gracias a los amigos que se quedaron conmigo hasta este punto de mi vida, pudiendo compartir no solo la vida escolar sino personal y familiar.

**Nsiveéni
Pokj
Gracias**

Contenido

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Problemas de ETA asociado al consumo de alimentos	3
2.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	4
2.2. El uso de Bacterias Ácido Lácticas en la Industria	5
2.2.1. Bacterias Ácido Lácticas	6
2.2.2. Metabolismo de los hidratos de carbono de las bacterias ácido lácticas	6
2.2.2.1. Homofermentativas	7
2.2.2.2. Heterofermentativas	7
2.2.3. Géneros de bacterias ácido lácticas (BAL)	9
2.3. Potencial antimicrobiano de las bacterias ácido lácticas	11
2.4. Bacteriocinas	12
2.4.1. Definición	12
2.4.2. Nisina	13
2.4.3. Clasificación de las bacteriocinas	14
2.4.4. Mecanismo de acción	16
2.5. Tecnología de Fermentaciones	20
2.5.1. Fermentación	20
2.5.2. Componentes de un proceso de fermentación	21
2.6. Producción de bacteriocinas	22
2.6.1. Crecimiento bacteriano	23
2.6.2. Medios de cultivo	25
2.7. Residuos agroindustriales	28
2.7.1. Melaza	29
2.7.1.1. Composición	31
2.7.2. Lactosuero	32
2.7.2.1. Composición	32
2.8. Problemática Ambiental	33

3. Justificación	36
4. Hipótesis	38
5. Objetivos	38
6. Metodología	39
6.1. Microorganismos	41
6.1.1. Microorganismos productores de sustancias similares a bacteriocinas: cepas de BAL	41
6.1.2. Microorganismo indicador: <i>Listeria monocytogenes</i>	41
6.2. Efecto de modificar la concentración de la fuente de carbono de los medios de cultivo en el crecimiento de las cepas de BAL	42
6.2.1. Medios de cultivo	42
6.3. Evaluación del uso de la lactosa por las cepas de BAL	43
6.4. Fermentación por lote a nivel de matraz	43
6.4.1. Fermentación de cepas de BAL en medio MRS comercial y medios de cultivo alternativos	43
6.5. Metodologías de análisis	44
6.5.1. Muestreo	44
6.5.2. Análisis microbiológicos	45
6.5.2.1. Evaluación del crecimiento	45
6.5.2.1.1. Cuenta en placa	45
6.5.2.1.2. Determinación de la concentración de biomasa. Peso seco	45
6.5.2.1.3. Parámetros cinéticos	46
6.5.2.2. Evaluación de actividad antimicrobiana	46
6.5.2.2.1. Método de Difusión en agar	46
6.5.3. Análisis fisicoquímicos	48
6.5.3.1. Determinación de pH	48
6.5.3.2. Cuantificación de azúcares	48
6.5.3.3. Cuantificación de proteína de los sobrenadantes	49
6.6. Estudio del comportamiento de nisina frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	50

7. Resultados y Discusión	51
7.1. Prueba de fermentación de lactosa por las cepas de BAL	51
7.2. Fermentación de cepas de BAL en medio MRS comercial (pH 6.4, 30°C)	52
7.2.1. Crecimiento celular y comportamiento del pH	52
7.3. Evaluación del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes	55
7.4. Fermentaciones de la cepa de <i>Streptococcus lutetiensis</i> A45212 en los medios de cultivo alternativos. Efecto de modificar la concentración de la fuente de carbono de los medios de cultivo	57
7.4.1. Crecimiento celular y comportamiento de pH	57
7.4.2. Evaluación de la concentración de la fuente de carbono	66
7.5. Evaluación del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes producidos por la cepa de <i>Streptococcus lutetiensis</i> A45212 en los medios de cultivo alternativos	70
7.6. Cuantificación de proteína	77
7.7. Estudio del comportamiento de nisina frente a <i>Listeria monocytogenes</i>	78
8. Conclusiones	82
9. Perspectivas	83
10. Anexo	84
11. Literatura Citada	97

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existe una tendencia importante por parte de los consumidores en demandar alimentos naturales o que sean mínimamente procesados y sin conservadores sintéticos. Los consumidores consideran que muchos alimentos procesados presentan una calidad nutrimental pobre y que los aditivos sintéticos son peligrosos para la salud. Como resultado de estas demandas, se tiene un gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben de ser inocuos, que cumplan con los parámetros de calidad y seguridad de las normativas aplicables para agentes antimicrobianos y que además presenten alto espectro de efectividad contra microorganismos patógenos.

En este sentido, las bacterias ácido lácticas (BAL), además de desempeñar papeles importantes en la fermentación de alimentos y que muestran una variedad de efectos positivos, saludables y nutricionales, son conocidas por la producción de compuestos con actividad antimicrobiana. Entre estas actividades, la producción de ácido láctico y ácido acético son claramente las más importantes, sin embargo, recientemente existe un gran interés en otro grupo de compuestos con estas propiedades, siendo las bacteriocinas las sustancias que tienen posibilidad de minimizar o eliminar el uso de conservadores químicos que pueden ser un riesgo para la salud humana (Elegado *et al.*, 2004).

Las bacteriocinas, proteínas biológicamente activas; exhiben propiedades antimicrobianas, principalmente hacia bacterias Gram positivo, mientras que las células productoras son inmunes a su propia bacteriocina (De Vuyst L, 1994; Klaenhammer, 1988; Cotter, 2005). La mayoría de estas tienen acción contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos (ETA's), tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Wu *et al.*, 2004; Jeevaratman *et al.*, 2005).

Por otro lado, la actual expansión agroindustrial ha llevado a una producción excesiva de varios subproductos y residuos agroindustriales de bajo. El aumento de estos residuos conlleva una serie de implicaciones relacionadas con aspectos de salubridad y medioambientales que son objeto de atención para las investigaciones en materia de ecología y medio ambiente y que aglutinan gran parte de los esfuerzos de los proyectos relacionados con el desarrollo sustentable (Basanta *et al.*, 2007). Hoy en día se sabe que la conducción en el control sustentable de los residuos industriales contribuye significativamente en el desarrollo de la economía de un país. Por lo que la aplicación de métodos químicos o procesos biotecnológicos para la recuperación o producción de metabolitos de valor agregado a partir de subproductos, residuos y efluentes representa una alternativa viable y a la vez un enorme reto (Mussatto *et al.*, 2011).

Recientemente se han tenido avances significativos en el empleo de subproductos o desechos agroindustriales para la obtención de productos de valor comercial, como lo son vitaminas, agentes antimicrobianos, antioxidantes naturales, enzimas, entre otros, los cuales son de gran interés para las industrias farmacéuticas, cosméticas y de alimentos (Murthy y Madhava Naidu, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. Problemas de ETA asociados al consumo de alimentos

La presencia de microorganismos en los alimentos es un suceso cuya evidencia se remonta a miles de años atrás, aunque tenemos conciencia de ello hace apenas poco más de 120 años, cuando nace formalmente la microbiología como ciencia. Los microorganismos presentes en los alimentos juegan un papel primordial no sólo en la producción de algunos subproductos cuyo valor agregado justifica generalmente su producción, sino en su descomposición y en el potencial daño a la salud de quien los consume. Existen grupos bacterianos que típicamente forman parte de la microbiota que pueden contribuir a la producción de diversos metabolitos y finalmente a las características sensoriales típicas de un alimento. Sin embargo, existen microorganismos patógenos como contaminantes típicos de diversos alimentos. Estos microorganismos provienen de fuentes externas al alimento (por ejemplo: suelo, heces, aire, agua de lavado, etcétera) y pueden llevar a cabo actividades indeseables de manera directa en el alimento promoviendo su descomposición y/o produciendo daños a la salud del consumidor (Macías y Torres, 2014).

Los problemas causados por los microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos pueden ser graves. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que los alimentos y el agua contaminados son los responsables de la muerte de 2.2 millones de personas anualmente, y que de éstos, 1.9 millones son niños. De acuerdo con el Sistema de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos (SIRVETA), en México, de 1997 a 2001 ocurrieron 461 brotes, de los cuales se especificaron 37.7%. De éstos aproximadamente la mitad fueron causados por virus y 26% por bacterias. Dentro de éstas, *Staphylococcus aureus* fue la que causó más brotes, seguida de *Clostridium perfringens* y posteriormente *Escherichia coli*.

Además de estos problemas graves, las ETAs causan problemas económicos, especialmente en los sistemas de salud, que usan una parte importante de su

presupuesto para el tratamiento de estas enfermedades. También afecta la productividad económica, tanto de quienes sufren las enfermedades (empeorando los problemas de la pobreza), como de las compañías donde se elaboran (Wacher, 2014).

2.1.1. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, con capacidad de formar biopelículas y de sobrevivir a diferentes temperaturas (>0-45 °C), pH extremo (9.6) y altas concentraciones de sal (>20%), características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua, agua residual y alimentos. *L. monocytogenes* es altamente resistente a los efectos de la congelación, el secado y el calentamiento. Esta última característica es especialmente notoria ya que se trata de una bacteria que no forma esporas. La contaminación de los alimentos por *L. monocytogenes* y su consecuente participación como agente responsable de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) son, por lo general, el resultado de eventos simultáneos que se presentan en varios puntos de la cadena alimentaria, entre los que se incluyen: a) alimentos y fuentes de contaminación del medio ambiente; b) condiciones que favorecen el crecimiento del patógeno (Lianou y Sofos, 2007), y c) falta de buenas prácticas de higiene y de programas de monitoreo en la cadena alimentaria (Zunabovic *et al.*, 2001).

La listeriosis es una infección bacteriana que se produce en animales y humanos causada por *Listeria monocytogenes*. Esta bacteria es una de las ocho especies del género *Listeria* (*innocua*, *ivanovii*, *welshimeri*, *seeligeri*, *marthii*, *rocourtiae* y *grayi*) y la única que se considera un patógeno de impacto para el hombre (Castañeda *et al.*, 2014).

En México, los estudios epidemiológicos sobre la incidencia y formas clínicas de la listeriosis, y sobre la presencia de *L. monocytogenes* en los alimentos son escasos. Al respecto, Castañeda y colaboradores (2014) hacen una revisión de 1982 a 2006 de la información existente sobre la listeriosis en México, refiriendo el reporte de 14 casos esporádicos de listeriosis con una letalidad de hasta 50%. Sin

embargo, la información específica de la fuente de infección y la caracterización del microorganismo responsable no se determinó. Aunque se ha realizado la caracterización mediante perfiles genéticos y serotipificación de cepas de *L. monocytogenes* de origen alimentario, no se ha logrado establecer su participación como agente responsable de ETA. Los datos de estos estudios sugieren la necesidad de que el sector salud y la industria alimentaria implementen un marco legal para la búsqueda obligatoria del patógeno, lo cual conlleve al control de éste en México (Castañeda *et al.*, 2014).

2.2. El uso de Bacterias Acido Lácticas en la Industria

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de microorganismos de gran importancia desde el punto de vista aplicado, ya que son los componentes fundamentales de muchos de los cultivos iniciadores utilizados en la industria alimentaria. Participan en la transformación primaria, y en muchos casos en la maduración de una gran variedad de alimentos fermentados donde se incluyen, entre otros, derivados lácteos, vegetales y cárnicos, productos de panadería, bebidas alcohólicas y también ensilados (Gilliland, 1986).

Las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos, desde tiempos prehistóricos, a través de los alimentos fermentados. Las actividades metabólicas de las bacterias lácticas no sólo contribuyen al desarrollo de las características sensoriales y reológicas de los alimentos fermentados sino que, además, permiten preservar el valor nutritivo y la inocuidad de la materia prima, proporcionando un producto agradable al consumidor y generando en él un ambiente poco favorable para el desarrollo de patógenos y otros microorganismos que pudieran alterarlos. Esta circunstancia, unida al hecho de que sólo muy raramente se les ha asociado a procesos patológicos (Gasser, 1994), ha contribuido a su designación como bacterias “seguras” o GRAS (Generally Recognized As Safe).

2.2.1. Bacterias Ácido Lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) constituyen un grupo de bacterias Gram positivo, anaerobias aerotolerantes, normalmente no móviles, no formadoras de esporas, catalasa negativas, con morfología de coco, coco-bacilo o bacilo, que fermentan hidratos de carbono para formar principalmente ácido láctico (Axelsson, 2006).

Las BAL son mesófilas, generalmente su temperatura óptima se encuentra entre 25°C y 30°C; y pH de 5.5 a 5.8. Otra característica de las BAL es que son débilmente proteolíticas y lipolíticas. La tolerancia a la sal (6.5% NaCl) puede ser utilizada para distinguir a los *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Streptococcus* (Santillán, 2004; Axelsson, 2006).

Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutrimentalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio *et al.*, 1994). Uno de los rasgos fisiológicos más característicos de las bacterias lácticas es su tolerancia al ácido como consecuencia obligada de su metabolismo, lo cual les ofrece una gran ventaja selectiva para desarrollarse en los hábitats donde se encuentran (Gilliland, 1990).

2.2.2. Metabolismo de los hidratos de carbono de las Bacterias Ácido Lácticas

La energía celular de las BAL procede de la fermentación de los hidratos de carbono para producir ácido láctico. Para llevar a cabo esta fermentación utilizan dos vías diferentes para la glucólisis: el esquema de Embden – Meyerhof - Parnas (EMP), con generación casi exclusiva de ácido láctico y la vía 6-fosfogluconato/fosfocetolasa, del que resultan otros productos finales como etanol, ácido acético y dióxido de carbono (CO₂).

Las BAL se clasifican como homofermentativas o heterofermentativas de acuerdo con su capacidad para fermentar glucosa únicamente a ácido láctico o a productos adicionales (Bibbins, 1992).

2.2.2.1. *Homofermentativas*

Los homofermentadores (*Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, y algunos *Lactobacillus*) producen lactato puro o casi puro (90%). Ellos metabolizan la glucosa a través de la vía EMP para producir dos moléculas de lactato por una molécula de glucosa. En la figura 1 se observa que el ácido láctico es el producto de esta fermentación. Las bacterias homofermentativas poseen las enzimas aldolasa y hexosa isomerasa, pero carecen de fosfoacetolasa. La reacción global para la homofermentación de glucosa puede escribirse como sigue:



2.2.2.2. *Heterofermentativas*

Heterofermentadores (*Leuconostoc*, *Weisella*, *Carnobacterium* y algunos *Lactobacillus*), convierten la glucosa en una mezcla equimolar de lactato, CO₂, etanol y/o acetato, a través de la vía de las pentosas-fosfato (figura 1). Se inicia por oxidación de la glucosa 6-fosfato seguido de descarboxilación y división de la pentosa 5-fosfato resultante en un resto C-2 y C-3. Así, cantidades equimolares de CO₂, lactato y acetato o etanol se forman a partir de hexosas (Kandler, 1983). La reacción global para la heterofermentación de glucosa puede escribirse como sigue:



Las bacterias heterolácticas son más importantes que las homolácticas desde el punto de vista de la producción de componentes de aroma y sabor, tales como acetaldehído y el diacetilo (Casp y Requena, 1999; Lyhs, 2002).

Aunque no tiene una consecuencia bioenergética directa, debe observarse que las BAL tienen la capacidad de fermentar una amplia gama de sacáridos incluyendo fructosa, galactosa, manosa, sacarosa, lactosa, maltosa y diversas pentosas.

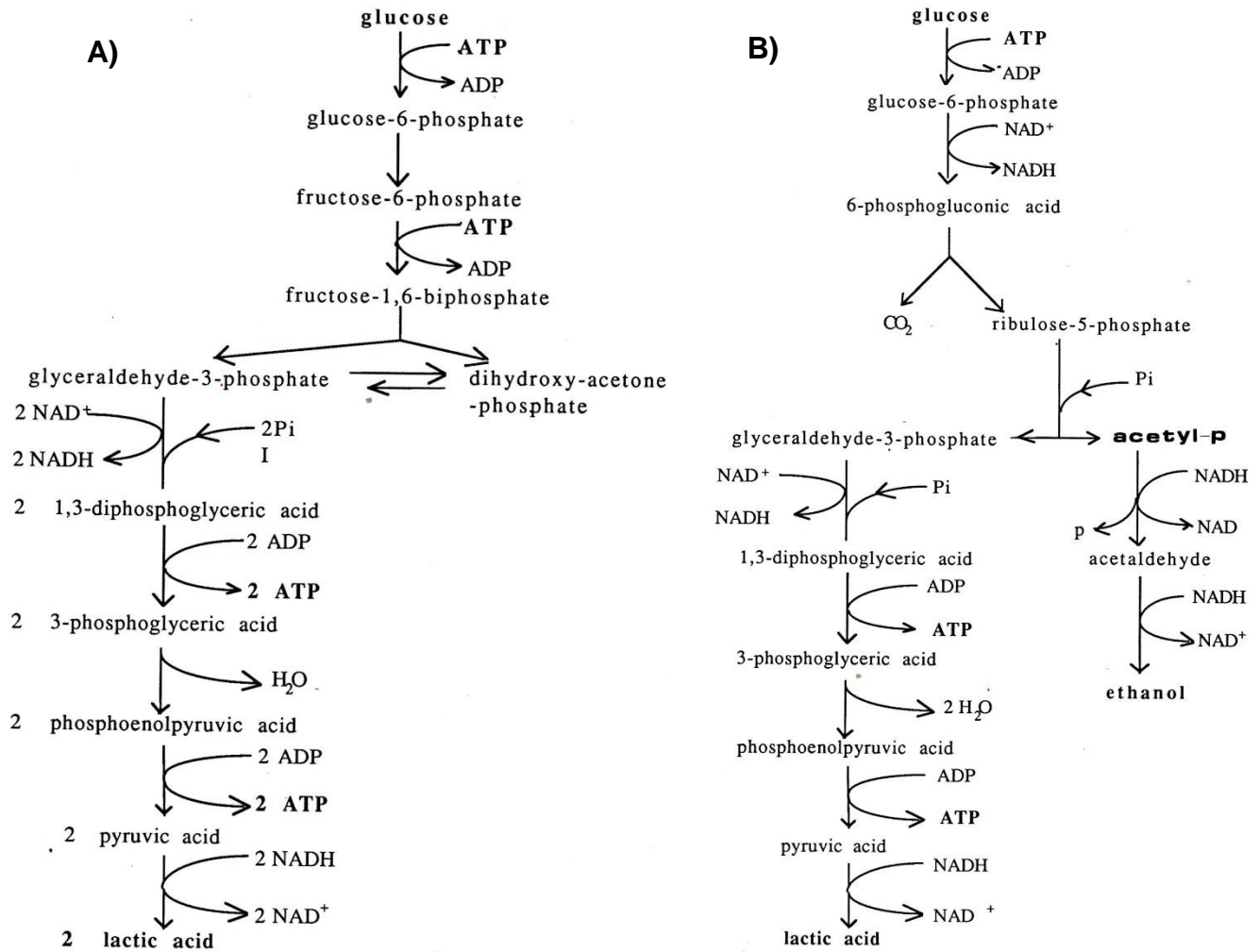


Figura 1. Asimilación de la glucosa por las bacterias ácido lácticas: A) Homofermentación y B) Heterofermentación (Stainer *et al.*, 1987).

2.2.3. Géneros de bacterias ácido lácticas (BAL)

Las BAL comprenden los cuatro géneros tradicionales: *Streptococcus* (actualmente subdividido en *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* y *Enterococcus*), *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, a los que se han añadido otros como: *Weissella*, *Oenococcus*, *Alloicoccus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium*. Así pues, la identificación e inclusión de las BAL en los diferentes géneros se basa en las características fenotípicas y morfológicas tradicionales, rutas de fermentación de la glucosa, desarrollo a diferentes temperaturas, configuración del ácido láctico producido, desarrollo a diferentes concentraciones de sal y tolerancia a pH ácido y alcalino, composición de ácidos grasos, homología ADN-ADN, secuencia del ARNr 16S y patrones de proteínas solubles (Fernández, 2000).

Los géneros que se describen a continuación son los que tienen mayor importancia en la microbiología de los alimentos:

Lactobacillus

El género comprende bacterias Gram positivo, con forma bacilar, catalasa negativa, aerotolerantes o anaerobios, acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), con requerimientos nutrimentales muy complejos.

Los límites de temperatura para desarrollar van de 2 a 53°C con óptima de 30 a 40°C. Se aíslan fácilmente de productos cárnicos, lácteos, de pescadería, agua, frutas, verduras y ensilaje. Los miembros de este género pueden ser homofermentativos y heterofermentativos, además producen mayor cantidad de ácido láctico que los *Streptococcus* y tienen una intensa actividad proteolítica, la cual se aprovecha en la maduración de los quesos (Casp y Requena, 1999).

Lactococcus

Son bacterias homofermentativas, microaerofílicas Gram positivo, el rango de temperatura óptima de crecimiento es de 20 a 35°C mientras que el pH de crecimiento óptimo es de 6.0 a 6.5. Se caracterizan por ser células ovoides que aparecen de forma individual, en parejas o en cadenas. Para su nutrición necesitan diversos aminoácidos y dependen también de diversas vitaminas (Stiles y Holzapfel, 1997). Son utilizados para la producción de lácteos. Dentro de las especies de *L. lactis*, dos subespecies, *lactis* y *cremoris* son las más ampliamente encontradas en las fermentaciones de productos lácteos. Este género tienen influencia en la calidad sensorial del queso durante su manufactura y maduración (Sánchez, 2003).

Streptococcus

Son cocos esféricos u ovoides de 0.8-1.2 μm , Gram positivo, típicamente dispuestos en pares o en cadenas, y son anaerobios facultativos. Este género fermenta un pequeño número de hidratos de carbono (Hassan *et al.*, 2001) y soporta una concentración máxima de NaCl de 2.5% (Fox *et al.*, 2000). Crece a un pH óptimo de 6.5 (Hassan *et al.*, 2001). Son más sensibles al oxígeno y poseen una considerable actividad superóxido dismutasa. Estas bacterias tienen en general una completa necesidad de factores de crecimiento: vitamina B, aminoácidos, péptidos, bases púricas y piridimícas. Ésta es una de las razones por las que abundan en un medio rico como la leche (Casp y Requena, 1999; Charles, 1998).

Enterococcus

Son células esféricas en forma de cocos, Gram positivo, dispuestas en pares o cadenas cortas, y son catalasa negativa. Son organismos que crecen entre 10 a 45°C, en 6.5% de NaCl y un pH de 9.6. Pueden sobrevivir a temperaturas de 60°C por 30 min. Son muy comunes en quesos, se detectan en más del 96% de variedades diferentes de quesos italianos. En muchos quesos se utilizan como cultivos iniciadores y las células que sobreviven a la pasteurización permanecen

activas y participan en la generación de aromas (Fernández, 2000; Stiles y Holzapfel, 1995).

Leuconostoc

Bacterias Gram positivo, de forma esférica o lenticular, en pares o cadenas, no móviles, no esporuladas, catalasa negativas y anaerobias facultativas. Crecen en rangos de temperatura de 20 a 37°C. Fermentan la glucosa a ácido láctico, CO₂, etanol o ácido acético, reduciendo el pH a 4,5-5,0. Se encuentra involucrado en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada, se usan en la elaboración de algunos quesos debido a la generación de aromas que pueden ser muy apreciados (Jay, 1992; Stiles y Holzapfel, 1995).

Pediococcus

Son cocos esféricos de 1.0-2.0 µm, Gram positivo, anaerobio facultativo; algunas cepas son inhibidas en presencia de oxígeno. Los pediococos están formados por células agrupadas en pares o tetradas. Son homofermentativos que fermentan los azúcares produciendo ácido láctico DL o L (+). Sus exigencias nutricionales, su débil actividad proteolítica y en la mayor parte de las especies su incapacidad para utilizar la lactosa, no les permite acidificar y coagular la leche. Las especies se diferencian por su tolerancia a la temperatura, al pH y al NaCl (Charles, 1998).

2.3. Potencial antimicrobiano de las bacterias ácido lácticas

La capacidad de producir grandes cantidades de ácidos (láctico, acético) por fermentación de los hidratos de carbono presentes y la consecuente caída del pH son los factores primarios en los que se basa la actividad antimicrobiana de las bacterias lácticas. Sin embargo, otros metabolitos inhibitorios también contribuyen significativamente a los fenómenos de antibiosis. Entre ellos cabe destacar la producción de H₂O₂, compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído), derivados deshidratados del glicerol (reuterina), benzoato, enzimas bacteriolíticas, antibióticos y bacteriocinas (Lindgren y Dobrogosz, 1990; Piard y Desmazeaud, 1991, 1992) .

Han sido muchas las estrategias desarrolladas por la industria alimentaria para explotar convenientemente el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas en todas sus facetas (Babel, 1977; Lingred y Dobogrosz, 1990), sin embargo actualmente existe un creciente interés por la utilización de las bacteriocinas como agentes antimicrobianos, teniendo implicación directa en la inhibición específica de microorganismos patógenos y/o alterantes asociados a los alimentos (Pucci *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1990; Ruiz-Barba *et al.*, 1994; Yang y Ray, 1994).

La creciente demanda del consumidor por productos naturales ha favorecido que las bacteriocinas producidas por BAL reciban atención en la investigación, debido a su aplicación potencial como sustancias conservadoras naturales en la industria de alimentos (Ten Brink *et al.*, 1994; Martinez *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2000), por lo que además de provocar una reducción en los organismos de deterioro, y proporcionar alimentos saludables, las aplicaciones de las bacteriocinas incluyen la disminución de ETA's (Enfermedades Transmitidas por Alimentos) , la mejora de la vida útil del producto y el mantenimiento del valor nutrimental de los alimentos (Gálvez *et al.*, 2007, 2011; Robertson *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2000).

2.4. Bacteriocinas

2.4.1. Definición

Las bacteriocinas producidas por BAL son sintetizadas ribosomalmente y secretadas extracelularmente, son pequeños péptidos o proteínas catiónicas (30 a 60 residuos aminoacídicos) con un alto punto isoeléctrico y características anfipáticas (Nes y col., 1996; Stiles, 1996).

La función biológica de las bacteriocinas es antimicrobiana, permitiendo a sus productores competir con otras bacterias para sobrevivir (Nes y col., 1996; Toit y col., 2000). Poseen actividad hacia bacterias Gram positivo estrechamente relacionadas, mientras que las células productoras son inmunes a su propia bacteriocina (Klaenhammer, 1988; De Vuyst L, 1994; Cotter, 2005;). El espectro antibacteriano incluye con frecuencia los organismos de descomposición y los

patógenos transmitidos por los alimentos, tales como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, etc.

Numerosas bacteriocinas son termoestables, siendo factible su aplicación en combinación con tratamientos térmicos; parecen tener un modo de acción bactericida e irreversible, son biodegradables, digeribles, seguras para la salud y activas a bajas concentraciones (De Vuys & Vandamme, 1994). Sin embargo, la única bacteriocina que se comercializa es la nisina, siendo útil en la prevención y protección contra microorganismos patógenos (Blackburn y de la Harpe, 1998).

2.4.2. Nisina

Es una bacteriocina producida por cepas de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Inhibe una amplia gama de bacterias Gram positivo, especialmente de los géneros *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listeria* (Maldonado y Llancas, 2007).

La nisina (figura 2) fue aprobada en 1961 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como aditivo para alimentos. En 1988 fue aprobada por la FDA con su consecuente introducción en el mercado americano. Su utilización ha sido exitosa, por lo cual se viene estudiando la posibilidad de explotar comercialmente otras bacteriocinas (O' Keeffe y Hill, 2000). En industrias alimentarias, donde *L. monocytogenes* prevalece en el ambiente de proceso, se puede utilizar nisina para el control del desarrollo de biopelículas de este patógeno en las áreas de proceso (Guerra *et al*, 2005), proporcionando una alternativa segura para el ser humano en comparación al alto nivel de desinfectantes químicos necesarios para eliminarlos.

La nisina se acompaña de otros compuestos para su comercialización. El producto más conocido que contiene nisina es Nisaplin®, la cual es una preparación que contiene nisina (2.5 %), NaCl como soporte (7.5 %) y leche seca sin grasa (12 % de proteína y 6 % de carbohidrato). El concentrado de nisina es estable a temperatura ambiente y estable al calentamiento bajo condiciones ácidas.

2.4.3. Clasificación de las bacteriocinas

Como se desprende de su propia definición, las bacteriocinas son compuestos inhibidores de naturaleza peptídica. De hecho, la inactivación por proteasas es uno de los primeros criterios para definir una sustancia antimicrobiana como bacteriocina.

Actualmente se conoce la estructura primaria de numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, bien por secuenciación directa de los péptidos purificados o por traducción del correspondiente ADN. Aunque la mayoría de ellas están constituidas por aminoácidos biológicos, es de destacar la presencia de aminoácidos modificados (lantionina y β -metil lantionina y sus precursores dehidroalanina y dehidrobutirina) en la forma activa de aquéllas que reciben el nombre genérico de lantibióticos. Incluso se ha identificado la presencia de D-alanina en la lactocina S, lantibiótico producido por *Lb. sake* (Skaugen *et al.*, 1994). No obstante, independientemente de su composición, las bacteriocinas son péptidos catiónicos (de 3 a 10 kDa), con un punto isoeléctrico alto, que comparten un marcado carácter hidrofóbico (Oscáriz y Pisabarro, 2001).

Teniendo en consideración sus propiedades físico-químicas, tamaño, espectro de inhibición y presencia de aminoácidos modificados, las bacteriocinas de las bacterias lácticas se han clasificado en 4 grandes clases (Klaenhammer, 1993):

Clase I (Lantibióticos): Son llamadas así porque son modificadas post-traduccionalmente por contener aminoácidos semejantes a lantionina y β -metionina, tienen un peso menor a 5 kDa.

- Se distinguen 2 tipos de lantibióticos, basados en sus características estructurales y mecanismos de acción bactericida.
 - i) Tipo A, péptidos de 2.1 a 3.5 kDa, de estructura terciaria tipo sacacorchos, anfipáticos y que actúan mediante la formación de poros al desporalizar la membrana citoplásmica. La nisina, producida por *L. lactis* subsp. *lactis* ha sido la más estudiada y

utilizada a nivel mundial por haber sido aprobada por la FDA y la OMS para su uso como bioconservador en alimentos.

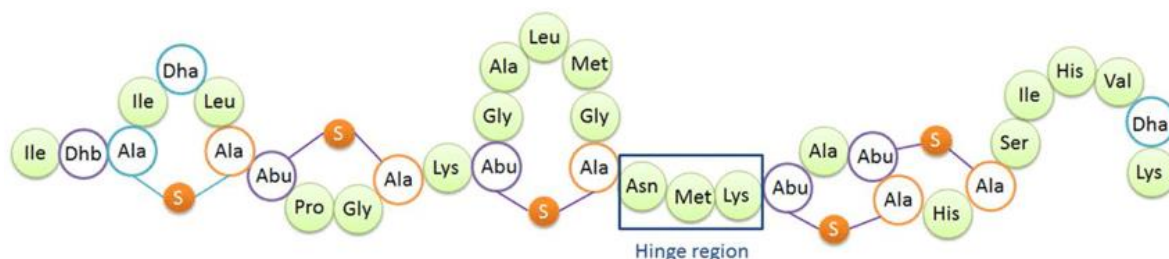


Figura 2. Estructura primaria de la nisina A (Zhou *et al.*, 2015).

- ii) Tipo B, péptidos de estructura globular, con tamaños comprendidos entre 1.9 y 2.04 kDa, sin carga o cargados negativamente. Su mecanismo de acción es mediante la inhibición de enzimas de la bacteria blanco, un ejemplo es la mersacidina producida por *Bacillus* spp. La cual interfiere con la biosíntesis de la pared celular (Heng et al., 2007).
- **Clase II (No lantibióticos):** péptidos con un peso menor a 10 kDa, estables al calor y que no contienen aminoácidos modificados en su estructura primaria. Junto con los lantibióticos es la clase más numerosa de bacteriocinas. Esta clase se encuentra organizada en subgrupos:
 - i) Tipo A: péptidos activos frente a *Listeria* que comparten una secuencia consenso en la región NH₂-terminal: -Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-. Al igual que el tipo A de lantibióticos, esta clase actúa formando poros en la membrana citoplásmica. Sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P.
 - ii) Tipo B: bacteriocinas cuya actividad biológica depende de la acción complementaria de dos péptidos distintos. En este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK.

- iii) Tipo C: Su actividad biológica depende del estado reducido de un residuo de cisteína al igual que ocurre con ciertas toxinas tiol-activadas (Boulnois *et al.*, 1991).
- **Clase III (Grandes péptidos):** proteínas de más de 30 kDa que están constituidas exclusivamente por aminoácidos no modificados y son sensibles al calor.
 - **Clase IV (Bacteriocinas complejas):** Son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica. Por tanto, esta clase incluye bacteriocinas que se consideran como glicoproteínas (lactocina S) o como lipoproteínas (mesenterocina 52).

2.4.4. Mecanismo de acción

En general, los agentes antimicrobianos, de acuerdo a su modo de acción sobre un cultivo bacteriano, se pueden clasificar como bacteriostáticos, bactericidas o bacteriolíticos. Los agentes bacteriostáticos suelen ser inhibidores de la síntesis de proteínas y actúan uniéndose a los ribosomas. Si disminuye la concentración del agente, el antimicrobiano se libera de los ribosomas y se reanuda el crecimiento. Los agentes bactericidas se unen fuertemente a sus células diana, provocan la muerte de la célula y no se eliminan por dilución. No obstante, las células muertas no se destruyen, y el número total de células se mantiene estable. Algunos bactericidas son también bacteriolíticos, que provocan la muerte celular por lisis y por liberación de contenidos citoplasmáticos. La lisis provoca una reducción del número de células y también de la turbidez del cultivo (Madigan *et al.*, 2009)

Diversos factores como la concentración de bacteriocina y el grado de purificación, el estado fisiológico de las células indicadoras y las condiciones experimentales afectan el modo de acción bactericida o bacteriostático de las bacteriocinas (Cintas *et al.*, 2001).

Tabla 1. Clasificación de las bacteriocinas (Tomada y modificada de Ramírez, 2005)

Clase	Subclase	Características	Ejemplos	Microorganismo productor
I: Lantibióticos Contienen aminoácidos poco comunes como lantionina, metil lantionina, dehidrobutirina y dehidroalanina.	Ila	● Péptidos pequeños, catiónicos en forma de espiral.	Nisina A y Z Plantaricina	<i>L. lactis</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lb. plantarum</i> C11
	Ilb	● Péptidos aniónicos o neutros de forma globular.	Mersacidina Mutacina A Cinamicina	<i>Bacillus</i> sp. HILY-85.54728 <i>Streptococcus mutans</i> <i>Streptomyces cinnamoneus</i>
II: No lantibióticos Péptidos termistables (110°C-121°C) con masas moleculares de 10 kDa. No contienen aminoácidos modificados	Ila	● Péptidos activos contra <i>Listeria</i> . ● Tienen la secuencia en la región N-terminal TGNGVXG.	Pediocina PA-1 Sakacina A y P	<i>P. acidilactici</i> PAC-1.0 <i>Lb. sake</i> LB706 y LTH1147
	Ilb	● Requieren de dos péptidos diferentes para una mejor actividad antimicrobiana	Lantococcina G Plantaricinas EF y JK	<i>L. lactis</i> LMG2081 <i>Lb. plantarum</i> C11
	Ilc	● Se transportan mediante péptidos líder	Divergicina A Acidocina B	<i>C. divergens</i> LV13 <i>Lb. acidophilus</i> M46
III Péptidos grandes termolábiles		● Poseen una masa molecular mayor de 30 kDa ● La mayoría son producidos por el género <i>Lactibacillus</i>	Helveticina J Acidofilicina A Lactacinas A y B	<i>Lb. helveticus</i> 481 <i>Lactobacillus</i> spp. <i>Lactobacillus</i> spp.
IV Bacteriocinas complejas		● Son proteínas con lípidos y/o hidratos de carbono asociados para ser activas.	Leucocina S Lactocina 27	<i>Leu. paramesenteroides</i> <i>Lb. helveticus</i> LP27

El modo de acción de las bacteriocinas es relativamente común para todas las bacteriocinas estudiadas hasta el momento. El sitio primario de acción se encuentra en la membrana celular de las bacterias sensibles a las que se adhieren de manera específica o no. Por lo general, actúan destruyendo la integridad de la membrana citoplasmática a través de la formación de poros, lo que provoca la salida de compuestos pequeños o altera la fuerza motriz de protones necesaria para la producción de energía y síntesis de proteínas o ácido nucleicos (Chikindas *et al.*, 1993; Montville y Chen, 1998).

Abbe (1995) y González (2003), con sus respectivos colaboradores, señalan que es posible que las clases I y II de las bacteriocinas compartan mecanismos de acción semejantes. Al parecer, los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente, luego se insertan a la membrana con una reorientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH y la composición fosfolipídica. Los monómeros de bacteriocina forman agregados proteicos que resultan en la formación del poro con la consecuente salida de iones (principalmente potasio y magnesio), pérdida de la fuerza proton motriz (FPM), salida de ATP y aminoácidos. La fuerza proton motriz juega un papel central en la síntesis de ATP, en el transporte activo y el movimiento bacteriano, por lo tanto, se inhibe la síntesis de macromoléculas y la producción de energía dando como resultado la muerte celular.

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la fuerza proton motriz en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. En la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula blanco ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula (Abee *et al.*, 1994). En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepcina se requiere de la unión a receptores membranales (Kok *et al.*, 1993). Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región consenso amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula blanco (Bruno y Montville, 1993; Eijsink *et al.*, 1998). En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos a y

b para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (Moll *et al.*, 1999). La clase III, tiene un modo de acción y una estructura compleja. Su mecanismo de acción es diferente al de otras bacteriocinas. Su porción N-terminal es homóloga a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la parte C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula blanco (Lai *et al.*, 2002).

En general, es probable que las estructuras secundarias de los péptidos activos tengan un papel importante en la actividad biológica ya que las α -hélices y láminas β plegada son anfifílicas, lo que sugiere una oligomerización de los monómeros en las membranas de acuerdo al mecanismo de formación de poros denominado "barrel-stave" con los lados hidrofóbicos hacia parte lipídica de la membrana y los hidrofílicos formando el poro del canal. En la figura 3 se muestran diferentes ejemplos de las clases de bacteriocinas, así como su probable modo de acción (Cotter *et al.*, 2005).

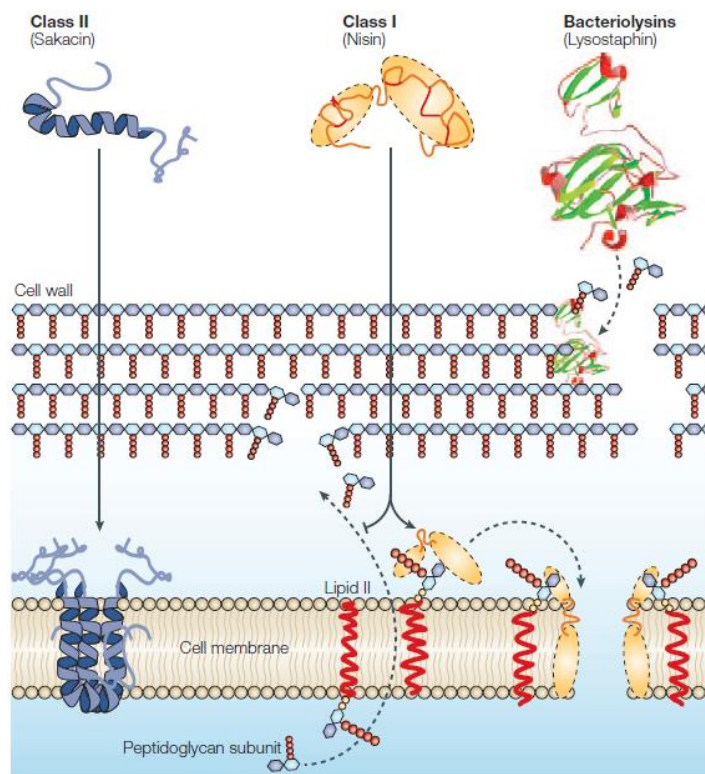


Figura 3. Mecanismo de acción de las diferentes clases de bacteriocinas (Cotter *et al.*, 2005).

2.5. Tecnología de fermentaciones

2.5.1. Fermentación

Una disciplina central de la biotecnología tradicional, y parte clave de toda la biotecnología de hoy, es la fermentación. Sin embargo, el término ha llegado a tener diferentes significados para los bioquímicos y para los microbiólogos industriales. Su significado bioquímico se refiere a la generación de energía en el que los compuestos orgánicos actúan tanto como donadores de electrones o receptores terminales. La fermentación es menos eficiente en la generación de energía que la respiración (oxidación) debido a que el sustrato inicial no está completamente reducido, y por lo tanto toda la energía en el sustrato no se libera. Su significado en la microbiología industrial tiende a ser mucho más amplio, en donde el término se usa para describir cualquier proceso para la producción de algún metabolito por el crecimiento de los microorganismos.

Originalmente, los productos de fermentación microbiana que utilizamos se derivaron de una serie de reacciones enzimáticas catalizadas que los microorganismos utilizan para metabolizar la glucosa. En el proceso de metabolización de la glucosa para adquirir energía, los microorganismos sintetizan los subproductos que podemos utilizar: dióxido de carbono para levadura de pan, etanol para preparar vino y cerveza, ácido láctico para hacer yogur, y ácido acético. Cuando se lleva a cabo la fermentación, se acumula en el medio una mezcla de productos finales (tales como lactato, butirato, etanol y acetoina), sustancias responsables de los diferentes atributos en los alimentos fermentados, tales como sabor, vida media, textura y beneficios a la salud (Sobti y Pachouri, 2009).

2.5.2. Componentes de un proceso de fermentación

Independientemente del tipo de fermentación, un proceso establecido puede dividirse en seis componentes básicos (figura 4) (Stanbury, 1995):

- i) La formulación del medio a utilizar en el cultivo del organismo durante el desarrollo del inóculo y en el fermentador de producción.
- ii) La esterilización del medio, fermentadores y equipos auxiliares.
- iii) La producción de un cultivo puro y activo en cantidad suficiente para inocular el recipiente de producción.
- iv) El crecimiento del organismo en el fermentador de producción en condiciones óptimas para la formación del producto.
- v) La extracción del producto y su purificación.
- vi) La disposición de efluentes producidos por el proceso.

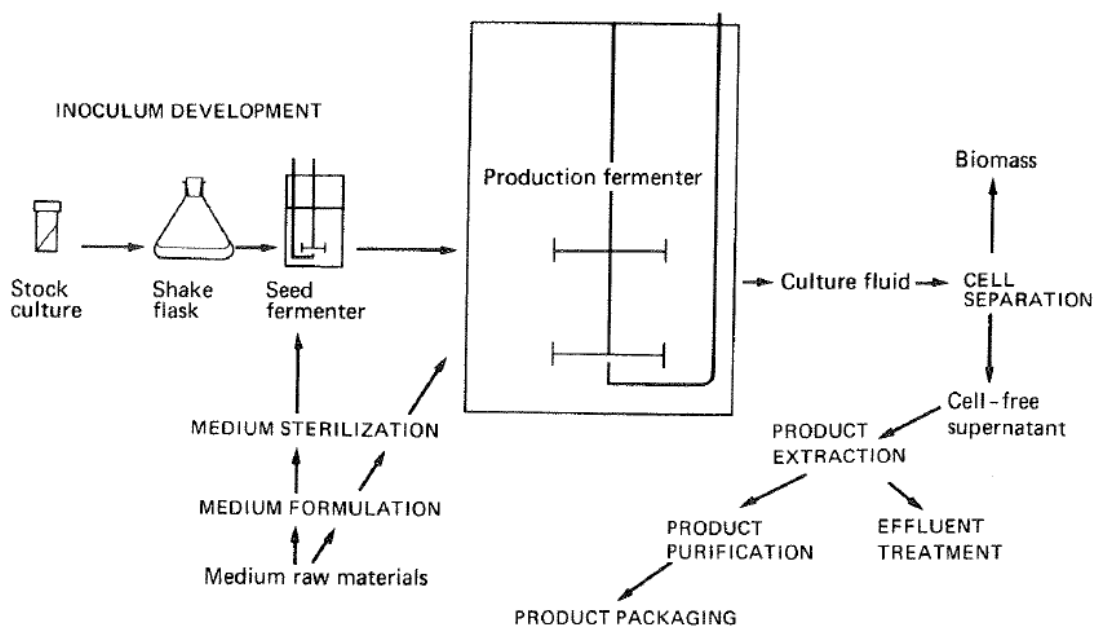


Figura 4. Representación generalizada de un proceso de fermentación (Stanbury, 1995).

2.6. Producción de bacteriocinas

La producción de las bacteriocinas ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando una relación directa con la biomasa producida. La producción de bacteriocinas depende del crecimiento y la actividad fisiológica de la cepa productora. En este sentido, aunque la producción de estos péptidos está generalmente asociada a la producción de biomasa, su clasificación como metabolitos primarios o secundarios no es clara (Guerra y Pastrana, 2002). Las principales variables que afectan la producción de bacteriocinas son la temperatura, el pH, la composición del medio de cultivo y la presencia de inductores (Guerra y Pastrana, 2002; Khay *et al.*, 2013). La temperatura tiene un efecto importante en la producción de bacteriocinas, existen reportes para valores de temperaturas de incubación entre 20 a 50 °C, en la mayoría de los casos se encuentra una coincidencia entre la temperatura óptima de crecimiento y de producción de bacteriocinas (Kim *et al.*, 2006; Khay *et al.*, 2013; Leroy y de Vuyst, 1999); no obstante, algunos autores también han demostrado que la producción de bacteriocinas puede darse en una temperatura alejada de la temperatura óptima de crecimiento (Faye *et al.*, 2002).

La mayoría de las bacteriocinas se han producido en sistemas por lotes (Leal-Sánchez *et al.*, 2002; Khay *et al.*, 2013; Gui y Li, 2013). Sin embargo, esta fermentación es ideal para estudiar la producción de bacteriocinas a nivel laboratorio pero no es económicamente viable a escala comercial. Por otro lado, la fermentación por lote alimentado o de alimentación discontinua, es una forma modificada de la fermentación por lote mediante la cual los sustratos que limitan el crecimiento se introducen en el fermentador a una velocidad controlada, lo cual permite un estricto control sobre la tasa de crecimiento, por ejemplo, la alimentación de la fuente de carbono controlada facilita una máxima tasa de crecimiento sin inhibición de sustrato que tiene un impacto en la tasa de producción de bacteriocinas.

El costo es uno de los factores importantes que afectan a la producción de bacteriocina y, por lo tanto, restringe la aplicación de la misma como un aditivo

alimentario (Hann *et al.*, 2011; Makar *et al.*, 2011). Para que el proceso o producto de fermentación sea económicamente viable, pueden emplearse diversos métodos. La sobreproducción de bacteriocina puede obtenerse mediante la mejora o modificación de la cepa, optimizando diversos parámetros del proceso incluyendo componentes de los medios, temperatura, pH, etc. (Vera Pingitore *et al.*, 2009; Abbasiliasi *et al.*, 2011; Saeed y Salam, 2013; Garsa *et al.*, 2014) haciendo el procesamiento más rentable. Como el costo del medio comúnmente utilizado es bastante alto, otro enfoque involucrado en la producción barata de bacteriocina es el uso de sustratos crudos (subproductos industriales con un valor mínimo o nulo), con cantidades adecuadas y suficientes de nutrientes balanceados necesarios para el crecimiento y la formación del producto (Guerra *et al.*, 2001).

Según el informe sobre el mercado de conservantes alimentarios: la tendencia mundial y pronóstico para 2018, el mercado mundial crecerá a una tasa de crecimiento anual de 2.4% demanda compuesta mayormente de conservadores naturales debido a las preferencias de los consumidores por conservadores seguros (<http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/foods-preservatives-market-420.html>), confirmando lo atractivo que resulta la producción masiva de bacteriocinas.

2.6.1. Crecimiento bacteriano

En microbiología, el crecimiento se define como un aumento en el número de células microbianas de una población. El aumento de masa, por sí solo, podría no indicar un crecimiento real, ya que las células podrían estar incrementando su contenido únicamente en productos de reserva, tales como el glucógeno o el poli- β -hidroxibutirato. En un medio adecuado, y al cual se han adaptado perfectamente, las bacterias se encuentran en un estado de *crecimiento equilibrado*, durante el cual la duplicación de la biomasa va acompañada de una duplicación de todas las demás propiedades medibles de la población, por ejemplo, proteínas, ARN, ADN y agua intracelular. En otras palabras, los cultivos en *crecimiento equilibrado* mantienen una composición química constante (Stainer, 1996).

En el caso de un cultivo en donde se posee un volumen de medio dado y no sea retirado medio agotado ni sea añadido nuevo medio (cultivo discontinuo), se obtiene una típica *curva de crecimiento*. Esta curva se representa normalmente como el número de células en una escala logarítmica frente al tiempo de cultivo (figura 5). Tal representación muestra el estado de las poblaciones bacterianas y no de microorganismos individuales. Esta curva de crecimiento se divide en fases llamadas fase *lag*, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

Fase Lag o de latencia: en esta fase los microorganismos se adaptan al medio y condiciones de cultivo. Los microorganismos van a producir los sistemas de transporte y enzimáticos necesarios para el medio y las condiciones de cultivo. Se caracteriza por no haber un aumento en número de células aunque la masa celular si puede aumentar, pero es mínimo. La duración de esta fase depende de las condiciones fisiológicas y de la concentración del inóculo. La duración de esta fase va a redundar en el rendimiento final de una fermentación y, por lo tanto, en su productividad.

Fase logarítmica o exponencial: en esta fase los microorganismos ya adaptados al medio, alcanzan la mayor velocidad de crecimiento en esas condiciones. Mientras haya sustrato en exceso y no se acumulen ningún metabolito toxico, el aumento de la cantidad de células o la biomasa será exponencial y constante. La actividad metabólica es máxima, el tamaño bacteriano se reduce, las estructuras (pared celular, membrana) presentan un espesor mínimo, la sensibilidad a los agentes físicos, químicos, antibacterianos y fisiológicos son más evidentes. Por lo anterior, también es durante esta fase cuando las bacterias sintetizan compuestos de defensa, tal es el caso de las bacteriocinas. En la fase log se alcanza la tasa máxima de crecimiento (μ_{max}). La μ_{max} depende de las condiciones de cultivo por ejemplo la temperatura y del sustrato.

Fase estacionaria: en esta fase no se incrementa el número ni la masa de bacterias. La lisis de las primeras células ayuda a mantener a otras. Las células en fase estacionaria desarrollan un metabolismo diferente al de la fase exponencial y, durante ella, se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios

que pueden tener importancia industrial. Los microorganismos entran en fase estacionaria porque se agota algún nutriente esencial del medio o la acumulación de productos finales del metabolismo (ácidos orgánicos o alcoholes) obtenidos a partir de la degradación de los hidratos de carbono y enzimas autocatalíticas del tipo de las proteasas y de las nucleasas actúan como inhibidores de crecimiento.

Fase de muerte: agotadas las reservas de energía se genera la muerte y lisis celular en forma exponencial, la duración de esta fase depende del microorganismo. Desde el punto de vista microbiológico, un microorganismo muere cuando pierde de forma irreversible la capacidad de dividirse (Quesada, 2013).

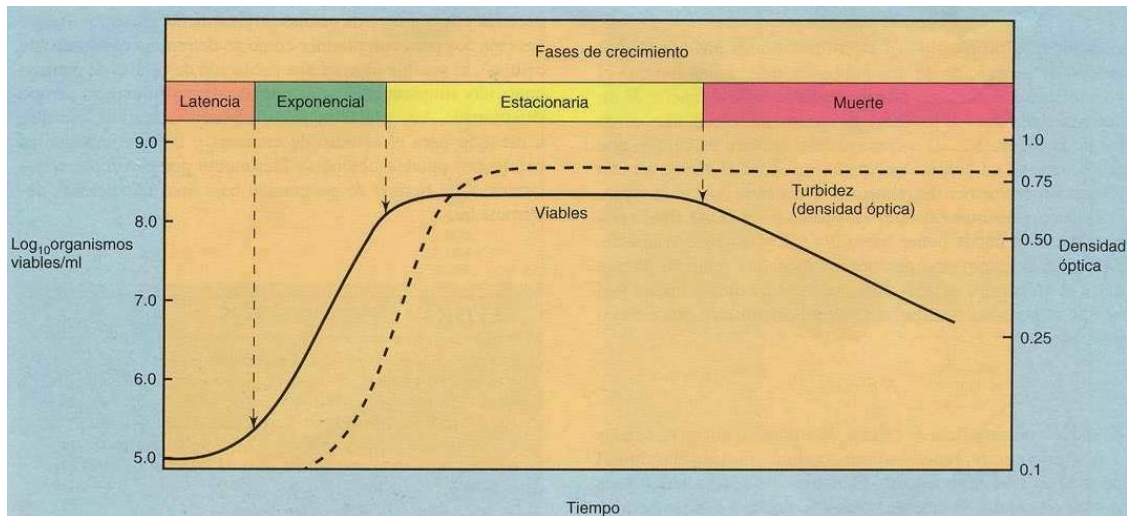


Figura 5. Curva típica de crecimiento de una población bacteriana (microbiologia3bequipo5.blogspot.mx/2014/10/curva-del-crecimiento.html).

2.6.2. Medios de cultivo

Un medio de cultivo es un conjunto de nutrimentos, factores de crecimiento y otros componentes que crean las condiciones necesarias para el desarrollo de microorganismos. La diversidad metabólica de estos es enorme. Por ello, la variedad de medios de cultivo es también amplia, y no existe un medio de cultivo universal adecuado para todos ellos.

De manera inicial se necesita establecer el medio más adecuado para llevar a cabo el proceso de fermentación con el objetivo de asegurar la productividad del mismo. Ciertos requisitos básicos se deben cumplir para cualquier medio. Todo microorganismo requiere agua, fuentes de energía, carbono, nitrógeno, minerales y vitaminas, y oxígeno, en el caso de que sea aeróbico. Los medios de cultivo deben ser optimizados para cada proceso fermentativo, así como también se hace con otros parámetros como temperatura y pH; con el fin de obtener la máxima producción.

A pequeña escala es relativamente sencillo idear un medio que contiene compuestos puros, pero el medio resultante, aunque ofrece un crecimiento satisfactorio para el organismo de interés, puede ser inadecuado para su uso en un proceso a gran escala. Para este caso, se debe utilizar normalmente fuentes de nutrientes para crear un medio que satisfaga al máximo posible los siguientes criterios:

- i) Producirá el rendimiento máximo de producto o biomasa por gramo de sustrato utilizado.
- ii) Producirá la concentración máxima de producto o biomasa.
- iii) Permitirá la máxima tasa de formación del producto.
- iv) Habrá el mínimo rendimiento de productos no deseados.
- v) Será de una calidad constante y estará disponible a lo largo del año.
- vi) Causará problemas mínimos durante la fabricación de los medios y la esterilización.
- vii) Causará problemas mínimos en otros aspectos del proceso de producción, particularmente aireación y agitación, extracción, purificación y tratamiento de residuos.

Las BAL se asocian a hábitats ricos en nutrimentos, como son diversos productos alimenticios tales como leche, carne, bebidas, granos y vegetales, aunque también a la superficie de las mucosas de animales (Barak *et al.*, 2000). El medio de cultivo MRS fue desarrollado por Man, Rogosa y Sharpe (1960) como un

medio de enriquecimiento, cultivo y aislamiento de *Lactobacillus* y otras bacterias ácido lácticas de diferentes tipos de muestras, tanto clínicas como provenientes de alimentos (Nilsson *et al.*, 2002; Leal-Sánchez *et al.*, 2002). Sobre sus constituyentes se puede decir que la fuente de carbono, nitrógeno y otros se encuentra en la presencia de glucosa, peptona y extracto de carne, los cuales son elementos necesarios para el crecimiento bacteriano. El magnesio, el manganeso, polisorbato y acetato son los cofactores presentes en el medio, mientras que el citrato de amonio es un inhibidor de microorganismos Gram negativos.

Para la producción de bacteriocinas, la composición del medio de cultivo también afecta a la producción de estas sustancias (Wescombe y Tagg, 2003; Zalán *et al.*, 2005). En general los medios complejos que contienen una fuente rica en nitrógeno son óptimos para el aumento de producción de bacteriocinas (Kemperman, 2003; Kawai, 2003). La producción de bacteriocinas también puede verse afectada por la facilidad con que estas son excretadas al medio de cultivo, para favorecer este aspecto se ha empleado la adición de surfactantes tales como Tween 80 que estimula la secreción de péptidos al influenciar la fluidez de la membrana celular (Khay *et al.*, 2013; Monroy *et al.*, 2009; Taheri *et al.*, 2012).

La producción de bacteriocinas se realiza normalmente en medios de crecimiento complejo: de Man, Rogosa y Sharpe (MRS), de uso múltiple con Tween (APT), Elliker, infusión cerebro corazón (BHI), Extracto triptona glucosa (TGE), Caldo de soya Tripticasa (TSB) y Caldo de soya tripticasa extracto de levadura (TSBY). A pesar de que estos medios promueven un abundante crecimiento y niveles relativamente altos de bacteriocina, su elevado costo los hace inadecuados para una producción a gran escala. Además, algunos componentes del medio, por ejemplo grandes cantidades de proteínas, que no son totalmente consumidos por las cepas productoras al final de la fermentación, puede interferir con la purificación posterior de la bacteriocina (Barefoot y Klaenhammer, 1984).

Se han explorado varios subproductos industriales de las industrias de procesamiento de alimentos, ricos en fuentes de carbono y nitrógeno como medio nutritivo de bajo costo para la producción de bacteriocina. Como ya se había

señalado en la sección 3.5.2, la viabilidad de la producción biotecnológica de metabolitos de interés está sujeta a que las materias primas cumplan una serie de características, además también deben de ser baratas, producir bajos niveles de contaminantes, capacidad para ser fermentado con poco o ningún pre-tratamiento y disponibilidad durante todo el año. El uso de la melaza de caña, melaza de remolacha, cereales, almidón, glucosa, sacarosa y lactosa como fuente de carbono, han tendido a satisfacer la mayor parte de los criterios anteriores para los medios de producción, ya que son sustratos baratos.

2.7. Residuos agroindustriales

Los residuos agroindustriales son materiales en estado sólido o líquido que se generan a partir del consumo directo de productos primarios o de su industrialización, y que ya no son de utilidad para el proceso que los generó, pero que son susceptibles de aprovechamiento o transformación para generar otro producto con valor económico, de interés comercial y/o social. Las características de los residuos agroindustriales son muy variadas, dependen de la materia prima y del proceso que los generó, no obstante, comparten una característica principal que es el contenido de materia orgánica. El problema al que se enfrentan estos residuos agroindustriales, es que no existe una clara conciencia ambiental para su manejo, además de que falta capacidad tecnológica y recursos económicos para darles un destino final, así como una legislación específica para promover la gestión de este tipo de residuos, que asegure un buen manejo desde su generación hasta su disposición final (Wang *et al.*, 2008).

Los residuos agroindustriales pueden ser de origen animal o vegetal, y se pueden dividir en siete grupos: (I) cereales, (II) raíces y tubérculos, (III) plantas oleaginosas, (IV) frutas y verduras, (V) productos cárnicos, (VI) pescados y mariscos y (VII) productos lácteos (Galanakis, 2012). El Cuadro 2 muestra la clasificación de la industria alimentaria en México, según el INEGI en 2012, relacionada con residuos agroindustriales con potencial para su aprovechamiento.

Aspectos medioambientales y económicos tales como: la necesidad de utilizar subproductos o desechos industriales para disminuir las emisiones contaminantes, además el ahorro que representa utilizar los residuos para la obtención de productos de valor comercial evidencian la importancia de los residuos agroindustriales como materia prima para la producción de metabolitos de interés.

2.7.1. Melaza

La melaza es el residuo de cristalización final del azúcar, del que no se puede obtener más azúcar por métodos físicos. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que éste contiene, formándose un producto meloso semi cristalizado. Se describe por lo general como no comestible porque no se usa para consumo humano. Es uno de los residuos con mayor potencial de valorización y aprovechamiento por lo que frecuentemente se le considera otro producto de la fabricación o refinación de azúcar.



Figura 6. Melaza de caña de azúcar (www.zafranet.com/tag/melaza).

Tabla 2. Residuos agroindustriales de interés para su aprovechamiento (INEGI, Sistema de Cuentas Nacionales de México (SCNM) y SIREM, Sistema de Información Regional de México (2014).

Fuente	Tipos de residuos
Elaboración de alimentos para animales	Pastas proteicas Estiércol (explotaciones ganaderas) Lodos
Elaboración de productos lácteos	Suero Lodos de aguas residuales
Molienda de granos y semillas y obtención de grasas y aceites	Pastas solidas proteicas Residuos líquidos con alto contenido de grasa
Elaboración de azúcares, chocolates, dulces y similares	Caña de azúcar (bagazo, melazas, cachaza, cenizas, residuales líquidos, paja, cogollo)
Conservación de frutas, verduras y alimentos preparados	Residuos de material verde (tallos, hojas) Residuos líquidos de procesos de lavado
Matanza, empacado y procesamiento de carne de ganado, aves y otros animales comestibles	Sangre Contenido ruminal
Elaboración de productos de panadería y tortillas	Salvado
Otras industrias alimentarias	Destilerías (mostos residuales, vinaza)
Industria de las bebidas y del tabaco	Residuos líquidos de proceso de lavado Residuos de material verde (cáscaras, hojas, tallos, bagazo de frutas)

2.7.1.1. Composición

La melaza es una mezcla que contiene sacarosa, azúcar invertido, sales y otros compuestos solubles en álcali presentes en el jugo de caña. Aproximadamente el 60% de los sólidos está compuesto por sacarosa, glucosa y fructosa. Los principales componentes de la melaza son el agua y los hidratos de carbono, pero se encuentran además compuestos no azúcares de origen orgánico como: aminoácidos, ácidos carboxílicos alifáticos y olefínicos, vitaminas, proteínas y fenoles, entre otros. La composición de la melaza es en extremo variable por lo que no es posible formular un análisis típico. Aun así, la composición promedio porcentual de sus macro componentes se muestra la tabla 3.

Tabla 3. Composición Promedio de la Melaza. (ICIDCA-GEPLACEA-PNUD, 1990)

Componente	Base seca (%)
Agua	13.9
Sacarosa	36.2
Glucosa	4.5
Fructosa	6.4
Cenizas	12.4
Coloides	9.6
Otros no azúcares	17.0

Existen estudios donde se ha utilizado medios a base de melaza (3% p/v) para analizar el potencial de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus plantarum* BN como bioconservante de carne cruda, prologando la vida útil de la carne de 3 a 9 días (Fiorentini *et al.*, 2001). De igual forma se observó un crecimiento comparable de *Lactobacillus plantarum* AMA-K, productor de bacteriocina; en medios basados en melaza (10% p/v) en comparación con MRS (Todorov, 2008). Por lo que es evidente que por su alto contenido de azúcares (Cuadro 3) resulta muy apropiado su uso en los procesos fermentativos.

2.7.2. Lactosuero

El lactosuero, suero lácteo o suero de queso es el líquido que se separa de la leche cuando ésta se coagula para la obtención del queso, son todos los componentes de la leche que no se integran en la coagulación de la caseína. La calidad y el tipo de suero de la producción de queso difieren según el tipo de queso que se produzca y el control del proceso del queso (Tetrapak®).



Figura 7. Generación de lactosuero en la elaboración de queso (www.hablemosclaro.org/noticias/suero-de-leche.htm y azdiario.mx/2017/06/13/contaminan-al-rio-naolinco-con-lactosuero).

2.7.2.1. Composición

Al representar cerca del 90% del volumen de la leche, contiene la mayor parte de los compuestos hidrosolubles de ésta, el 95% de lactosa (azúcar de la leche), el 25% de las proteínas y el 8% de la materia grasa de la leche. Existen dos tipos de lactosuero, el lactosuero dulce y el lactosuero ácido, el primero se obtiene en la elaboración de lácteos en donde se utiliza la coagulación enzimática con un pH cercano a 5.6. El lactosuero ácido se produce cuando la coagulación es por acidificación a un pH de 5.1 o menor (Arrojo *et al.*, 2003). La composición del suero dulce y ácido se indica en la tabla 4.

Por su alto contenido en lactosa, además por su contenido en minerales, vitaminas y proteínas solubilizadas en agua, el lactosuero puede ser utilizado como medio de cultivo para la producción de biomasa (proteína unicelular como la

levadura para panificación), metabolitos (lípidos, pigmentos, alcoholes, ácidos orgánicos, biopolímeros) y enzimas (Valencia y Ramírez, 2009).

Tabla 4. Composición del suero dulce y ácido, por ciento m/m (Kirk *et al.*, 2009).

Constituyente	Suero dulce	Suero ácido
Sólidos totales	6.35	6.9
Humedad	93.65	93.5
Grasa	0.3	0.04
Proteínas	0.8	0.75
Lactosa	4.65	4.9
Minerales	0.5	0.8
Ácido láctico	0.05	0.4

El lactosero es una materia prima prometedora para la producción biotecnológica de polihidroxialcanoatos (PHAs), bioetanol y otros compuestos de valor agregado (Povolo *et al.*, 2010; Cota-Navarro *et al.*, 2011; Dragone *et al.*, 2011; Prazeres *et al.*, 2012). Sin embargo, sólo se han descrito algunos estudios que describen el uso de este subproducto industrial como sustrato para la producción de bacteriocinas (Cladera-Oliviera *et al.*, 2004; Leaes *et al.*, 2011).

2.8. Problemática ambiental.

La importancia que tiene la conservación de los recursos naturales ha despertado en la sociedad la búsqueda de soluciones para cuidarlos y recuperarlos con el fin de que sean aprovechados por los seres vivos. Cuando los residuos agroindustriales son dispuestos sobre el suelo sin ningún tratamiento previo y permanecen a la intemperie, su descomposición los puede convertir en residuos peligrosos principalmente por la presencia de agentes infecciosos, por el daño que pudieran causar a humanos, animales y a los recursos naturales.

Los sólidos y las aguas residuales derivados del procesamiento de productos lácteos son, en su mayoría, de origen orgánico (proteínas, carbohidratos, lípidos, aceites y grasas), con una alta demanda química y bioquímica de oxígeno (DQO y DBO), alta concentración de sólidos suspendidos y contenido de nitrito (Britz *et al.*, 2006). A pesar de la riqueza nutricional del lactosuero, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación.

La descarga continua de suero en estos ecosistemas altera sus propiedades fisicoquímicas. En el caso de los suelos, disminuye el rendimiento de las cosechas, pero además se observa el fenómeno de lixiviación. Este fenómeno se presenta porque el lactosuero contiene nitrógeno soluble en agua, el cual es arrastrado a través de diversas capas llegando hasta los mantos freáticos y convirtiéndose en un peligro para la salud de los animales y humanos.

Casos de contaminación se han reportado en México, en 2009 Guerrero y colaboradores evidenciaron el desecho de lactosuero al medio ambiente en la zona lechera del municipio de Acatlán, Hidalgo lo cual ha provocado la afectación en los cuerpos receptores de agua y terrenos de cultivo.



Figura 8. Descarga de suero en presa el Sabino, Hidalgo (izquierda) y arroyo (derecha) (Guerrero, 2009).

De igual forma, la melaza en la producción de caña de azúcar puede llegar a representar un problema de contaminación ambiental por los ingenios azucareros. La materia orgánica presente en la melaza se oxida en el agua. Para los microorganismos de los ríos, la melaza resulta un excelente alimento, activa su metabolismo y deja sin oxígeno a todo ser acuático. Esto provoca la obstrucción de las branquias de los peces y demás animales que ya no pueden extraer el oxígeno del agua y mueren por asfixia.

En 2013, se presentó un derrame de más de tres mil toneladas de melaza en la Presa del Hurtado en el municipio de Tlajomulco de Zúñiga en el estado de Jalisco, el cual provocó la muerte de miles de peces, entre 200 y 500 toneladas (Osorio, 2013). Otro caso de incidente se registró en mayo de 2016 en El Salvador, donde un derrame de 1.3 millones de galones de melaza contaminó un río de la periferia norte de la capital salvadoreña con una pérdida del 100% de la fauna en un tramo de 12 km del río (figura 9) (ContraPunto, 2016).

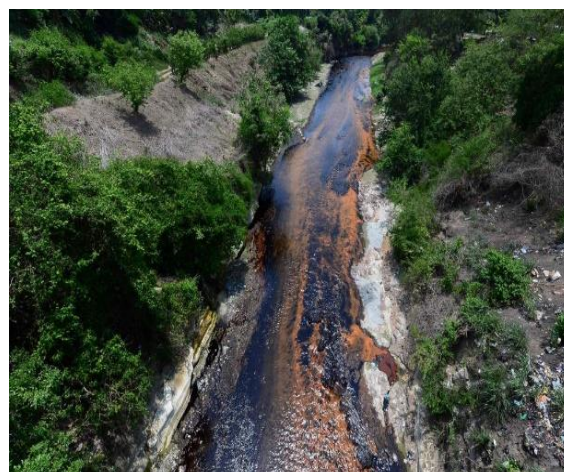


Figura 9. Muerte de peces por derrame de melaza en presa del Hurtado, Jalisco (izquierda) y contaminación del río Las Cañas por derrame de melaza, El Salvador (derecha). (Osorio, 2013 y ContraPunto, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de antimicrobianos es una práctica común en la industria de los alimentos, por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente, que en algunos casos han causado daño en la salud de los consumidores, redundando en un rechazo por parte de los mismos en los productos procesados; por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Nychas, 1995). De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimenticio, además sus propiedades físicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimenticios.

Sin embargo, el costo es uno de los factores importantes que afectan a la producción de bacteriocina y, por lo tanto, restringe la aplicación de la bacteriocina como aditivo alimentario (Han *et al.*, 2011; Makkar *et al.*, 2011). La producción de bacteriocinas se realiza normalmente en medios de crecimiento complejos, como el de Man, Rogosa y Sharpe (MRS). A pesar de que este medio promueve un abundante crecimiento y niveles relativamente altos de bacteriocina, su elevado costo los hace inadecuados para una producción a gran escala. Además, algunos componentes del medio, por ejemplo grandes cantidades de proteínas, que no son totalmente consumidos por las cepas productoras al final de la fermentación, puede interferir con la purificación posterior de la bacteriocina (Barefoot y Klaenhammer, 1984). Para una aplicación exitosa en la industria alimentaria, las bacteriocinas deben producirse a una alta concentración con alta productividad y rendimiento a bajo costo (Guerra y Pastrana, 2003).

Para este propósito, el uso de fuentes de carbono más baratas, especialmente aquellas generadas por procesos industriales o agrícolas, puede por lo tanto proporcionar una manera de reducir los costos de producción de bacteriocina, y dado que en México, los residuos generados del procesamiento de alimentos provenientes de la industria azucarera y láctea son considerados como contaminantes del medio ambiente, representan una buena opción. La generación de estos residuos es considerable, en nuestro país la producción de melaza durante la zafra 2012/2013 fue de 2.3 millones de toneladas de melaza (CONADESUCA), mientras que el lactosuero producido es de cerca de 1 millón de toneladas conteniendo 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína.

Lamentablemente, a pesar de la riqueza nutrimental del lactosuero, potencialmente utilizable, el 47% es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación. Mientras que la melaza como subproducto de la molienda de la caña de azúcar tiene una multitud de usos. No obstante, es la elaboración de alimentos para ganado bovino (carne y leche) donde se usa como insumo mayormente.

De acuerdo con lo anterior, en el presente trabajo se plantea el uso de melazas y lactosuero como ingredientes principales de medios de cultivo alternativos para la producción de bacteriocina por una cepa de *Streptococcus*, aislada del pozol, a nivel de matraz.

4. HIPOTESIS

Ya que tanto el lactosuero como la melaza de caña poseen un alto contenido de azúcares fermentables entonces su uso en la formulación de medios de cultivo resultará óptimo para el crecimiento de una cepa de *Streptococcus* spp. y la producción de sustancias similares a bacteriocinas.

5. OBJETIVOS

General

Obtener sustancias similares a bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus* spp. en medios de cultivo no convencionales a base de lactosuero y melazas de caña.

Específicos

- Evaluar el crecimiento de una cepa de *Streptococcus* spp. en medio MRS y en los medios de cultivo alternativos propuestos a base de lactosuero y melaza de caña realizando fermentaciones a nivel de matraz.
 - Estudiar la producción de sustancias similares a bacteriocinas para cada uno de los medios propuestos (MRS y alternativos) a través de pruebas de difusión en agar.
-

6. METODOLOGÍA

La metodología seguida en el presente trabajo está dividida en 3 partes principales que a continuación se describen:

- En la primera parte se realizaron fermentaciones de cepas de BAL en el medio MRS para evaluar el crecimiento y la actividad antimicrobiana de éstas con el fin de seleccionar la cepa que tuviera un mayor espectro de inhibición frente al microorganismo patógeno indicador.
- La segunda parte consistió en realizar los procesos de fermentación en los medios de cultivo alternativos a base de lactosuero y melazas de caña con la cepa que mostró una buena actividad antimicrobiana cultivada en el medio MRS. Evaluar el efecto de modificar la concentración de hidratos de carbono de estos residuos agroindustriales observando los cambios en el crecimiento bacteriano, consumo de la fuente de carbono y producción de las sustancias similares a bacteriocinas, durante la fermentación.
- La tercera parte tuvo como propósito observar el efecto de inhibición por separado de un producto comercial (Qualact N: Nisina), cuyo compuesto activo es la nisina, bacteriocina natural producida por *Lc. lactis*, frente a *L. monocytogenes* y comparar los resultados de este producto comercial con los obtenidos con la cepa de BAL aislada.

En la figura 5 se muestra un diagrama de flujo donde se resume de manera general la metodología experimental seguida, desde la reactivación y conservación de las cepas de BAL, una prueba para evaluar el uso de la lactosa por estas cepas y las fermentaciones llevadas a cabo. Además, se incluyen los análisis fisicoquímicos y microbiológicos efectuados en las muestras de la fermentación.

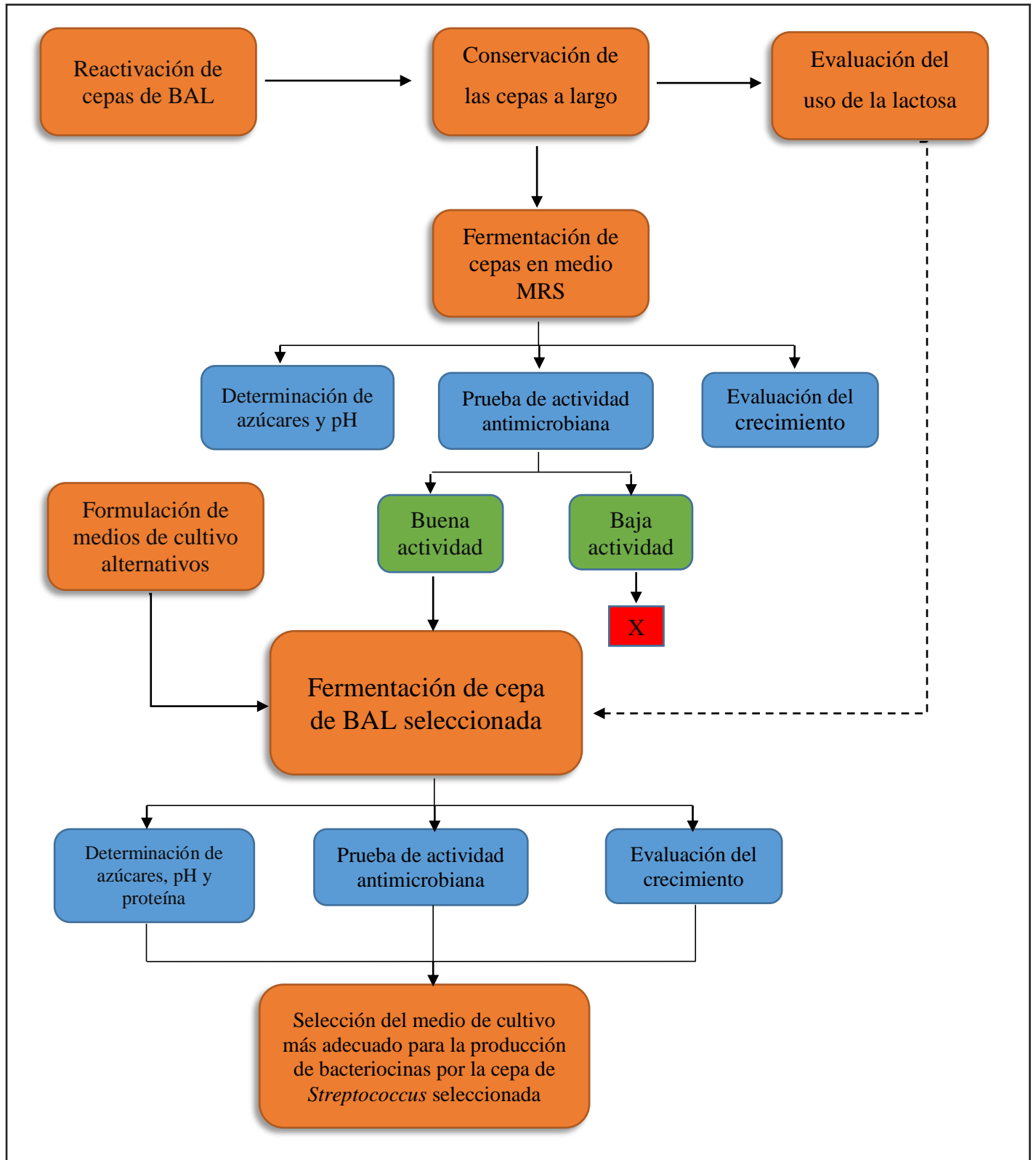


Figura 10. Esquema general de la metodología empleada en el desarrollo del proyecto.

6.1. Microorganismos.

6.1.1. Microorganismos productores de sustancias similares a bacteriocinas: cepas de BAL.

Para producir las sustancias similares a bacteriocinas se utilizaron cuatro cepas de BAL, aisladas de alimentos fermentados tradicionales, pozol y atole agrío, denominadas como 103, 115, 119 y A45212 (Valderrama, 2012; Díaz-Ruiz *et al.*, 2003). Estas cepas fueron seleccionadas como productoras de sustancias antimicrobianas en un trabajo previo (Maldonado, 2016). Hasta el momento estas cepas fueron identificadas como bacterias pertenecientes al género *Lactococcus*.

Las cepas se conservaron a largo plazo, en medio MRS (BD Difco®) con glicerol (al 20% v/v). Para lo cual, las cepas se reactivaron en medio líquido MRS estéril, inoculando al 1% v/v el cultivo original conservado en glicerol e incubándose a 30°C durante 24 h. Dichos cultivos se centrifugaron, se lavaron las células con solución salina (0.8%) y se resuspendieron en el medio MRS con glicerol. Los cultivos se congelaron a -70°C. Para la activación de las cepas de BAL, el cultivo original fue inoculado (1% v/v) en 5 mL de caldo MRS estéril e incubándose por 24 h a 30°C.

6.1.2. Microorganismo indicador: *Listeria monocytogenes*.

En un estudio previo (Tavera, 2010), se observó que algunas bacterias aisladas del pozol producían sustancias similares a bacteriocinas, que inhibían a *Listeria monocytogenes*, por lo que se utilizó una cepa de este microorganismo proporcionada por el cepario de la FQ-UNAM registrada con la clave CFQ-103 para observar si estas cepas de BAL cultivadas en medios no convencionales eran capaces de inhibir a dicho patógeno. Esta se conservó a -70°C, en viales con caldo BHI al 20% de glicerol (v/v). Para la activación de *L. monocytogenes*, el cultivo original fue inoculado al 1% v/v en 5 mL de caldo BHI estéril e incubándose por 24 h a 35°C un día antes de realizar la prueba de actividad antimicrobiana.

6.2. Efecto de modificar la concentración de la fuente de carbono de los medios de cultivo en el crecimiento de las cepas de BAL.

6.2.1. Medios de cultivo

Caldo MRS (BD Difco®) usado como medio de referencia para el cultivo de las cepas de BAL y producción de sustancias antimicrobianas.

Se propusieron dos medios de cultivo alternativos: Medio **MCE-1** (50% MRS y 50% Lactosuero en polvo) y Medio **MCE-2** (Melaza de caña (4% p/v), Extracto de levadura (0.5% p/v), Caldo de soya tripticaseína (2% p/v), $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ (0.1% p/v) y Tween 80 (0.3% p/v) (López, 2014).

Aunque una característica para la selección de residuos con fines de aprovechamiento es que no requiera ningún pretratamiento, para poder estudiar y comparar el efecto que tiene la fuente de carbono sobre el crecimiento y la actividad antimicrobiana, se realizó el ajuste de la concentración de hidratos de carbono en cada medio de cultivo alternativo a probar, tomando como base el contenido de glucosa en el medio MRS comercial; obteniendo así los medios de cultivo ajustados: **MCA-1** (base lactosuero) y **MCA-2** (base melaza de caña).

Todos los medios se prepararon con agua destilada, se ajustaron a pH=6.5 y fueron esterilizados a 121°C durante 15 minutos en autoclave. En el caso de los medios MCE-1 y MCA-1 para remover las proteínas precipitadas se centrifugó a 12000 RPM por 15 minutos, se filtró y los sobrenadantes fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos.

6.3. Evaluación del uso de la lactosa por las cepas de BAL.

Para identificar si las cepas de BAL tenían la capacidad de fermentar la lactosa se inoculó cada cepa, previamente reactivadas en medio líquido MRS; al 1% v/v en 5 mL de caldo rojo de fenol con lactosa (DIBICO®), incubándose a 30°C durante 24 horas. Cepas de *Salmonella* Nitra y *Escherichia coli* 27377, controles negativo y positivo, respectivamente; se reactivaron en medio BHI (OXOID) incubándose a 37°C durante 24 horas. Los controles se inocularon al 1% v/v en 5 mL de caldo rojo de fenol con lactosa llevándose a incubación a 37°C por 24 horas. La presencia de un color amarillo indica una reacción positiva para la fermentación de la lactosa.

6.4. Fermentación por lote nivel de matraz.

6.4.1. Fermentación de cepas de BAL en medio MRS comercial y medios de cultivo alternativos.

Para las cuatro cepas de BAL seleccionadas, se evaluó el medio de cultivo MRS comercial (BD Difco®) para su crecimiento y producción de sustancias antimicrobianas. En este trabajo se trabajaron las cepas A45212 y 119, mientras que las cepas 103 y 115 fueron evaluadas en un trabajo paralelo por Lara (comunicación personal).

Las cepas conservadas en congelación y reactivadas en medio líquido MRS fueron inoculadas al 1% v/v en 250 mL de medio MRS comercial, el cual se incubó durante 24 horas a 30°C con agitación orbital de 150 RPM. La fermentación se realizó por duplicado. Al tiempo cero se inoculo el matraz y comenzó el muestreo. La fermentación se monitoreo cada 3 horas hasta las 12 h, y una última a las 24 horas para evaluar los cambios en la concentración de la fuente de carbono, la actividad antimicrobiana y el crecimiento celular. De igual manera, cada hora y media, se monitoreo el pH.

Las fermentaciones con los medios de cultivo alternativos (MCE-1, MCE-2, MCA-1 y MCA-2) (figura 11) se realizaron con la cepa que presento un mayor

espectro de inhibición frente a *L. monocytogenes* en la prueba de difusión en agar. Siguiendo la metodología descrita anteriormente se realizó el cultivo en los medios propuestos (pH=6.5 y 30°C), se evaluó la actividad antilisteria y de igual forma se monitoreo el pH.

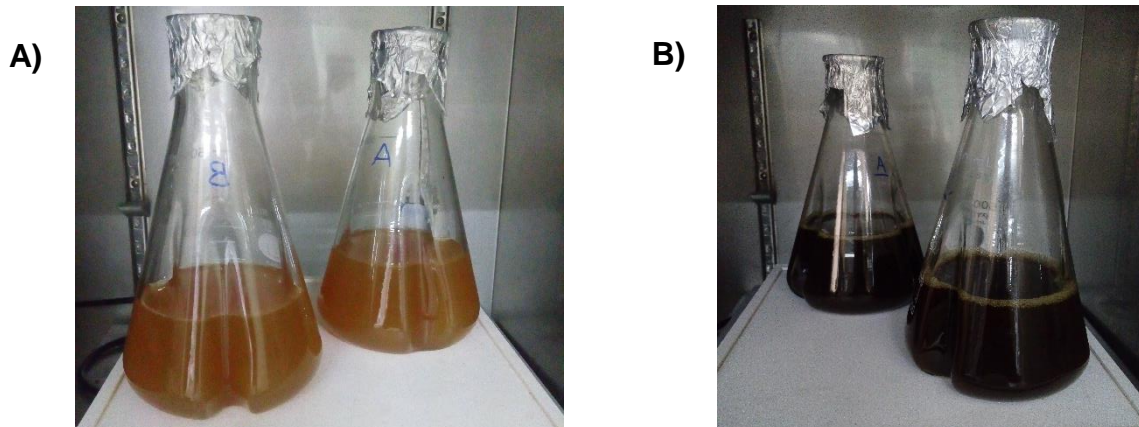


Figura 11. Fermentaciones a nivel de matraz en medios de cultivo alternativos: A) MCE-1 y B) MCE-2

6.5. Metodologías de análisis.

6.5.1. Muestreo.

Durante el muestreo cada matraz fue agitado con el fin de homogenizar el medio de cultivo. En cada tiempo de muestreo se tomaron 500 μ L que se utilizaron para la determinación de las cuentas microbianas en placa y 5ml para medir el pH. Además se tomaron 1.5 mL para la cuantificación de hidratos de carbono totales y reductores y 1.5 mL para determinar la actividad antimicrobiana. Todo esto por duplicado para cada repetición de cada fermentación realizada. Las muestras se guardaron en congelación (-20°C) hasta su análisis.

6.5.2. Análisis microbiológicos.

6.5.2.1. Evaluación del crecimiento.

6.5.2.1.1. Cuenta en placa.

Para monitorear el crecimiento bacteriano se utilizó el método de cuenta en placa por extensión. La cuenta en placa se llevó a cabo considerando las diluciones pertinentes para cada tiempo. Se inocularon por duplicado 0.1 mL de cada una de las muestras previamente homogeneizadas en placas con medio MRS. Las cajas se incubaron a 30°C por 24 horas. Para el conteo en placa, se tomaron en cuenta las colonias blancas y aquellas placas que tuvieron entre 30 y 300 colonias (Tavera, 2010). Con los datos de la cuantificación se realizaron gráficas con respecto al tiempo para obtener el comportamiento del crecimiento.

6.5.2.1.2. Determinación de la concentración de biomasa. Peso seco.

Para estimar el número de microorganismos totales o el número de microorganismos viables de las fermentaciones llevadas a cabo en los medios MCA-1 y MCA-2 se realizó una curva de calibración relacionando los datos de cuenta en placa vs. peso seco.

Para determinar el peso seco, las fermentaciones se realizaron por duplicado en volúmenes de 30 mL de medio directamente en tubos de centrifuga. Cumplido los tiempos de fermentación (mismos para determinar la cuenta en placa), los tubos se centrifugaron a 12000 RPM durante 15 minutos a 4°C para separar los caldos de fermentación de las células, el sedimento fue resuspendido en solución isotónica (0.8% NaCl) y se centrifugó a las mismas condiciones anteriormente mencionadas; el sobrenadante se decantó en cada lavado. Este lavado se llevó a cabo dos veces.

Por otra parte, se secaron membranas de 0.45 μ y 45 mm de diámetro (Millipore) hasta peso constante en un horno a 60°C. Las membranas se colocaron en el equipo de filtración (Millipore) y se humedecieron

uniformemente con agua destilada. Las células a filtrarse se homogeneizaron y se procedió a filtrar. Al final, se adicionaron 20 mL de agua destilada para lavar la membrana. Las membranas con las células se llevaron a un horno a 60°C hasta peso constante. La concentración de biomasa se calculó con la siguiente ecuación:

$$X = \frac{P_{m+x} - P_m}{V_m}$$

Donde X es la concentración de biomasa (g/L), P_m es el peso de la membrana (g), P_{m+x} es el peso de la membrana con biomasa (g) y V_m es el volumen de la muestra (L). Estos datos se graficaron en función del tiempo (López, 2014).

6.5.2.1.3. Parámetros cinéticos.

Se determinó la velocidad específica de crecimiento (μ_{max}), durante la fase exponencial; obtenida a partir de la pendiente resultante de graficar el logaritmo natural de UFC/mL en función del tiempo. El rendimiento de crecimiento (Y x/s) relativo al sustrato se calculó como la pendiente de la regresión lineal de la biomasa vs. sustrato residual (Díaz-Ruiz, 2003). Este cálculo se realizó con los datos obtenidos durante la fase exponencial de crecimiento. El consumo de sustrato (q_s) se calculó de acuerdo con Pirt (1985): $q_s = \mu / Y$ x/s.

6.5.2.2. Evaluación de actividad antimicrobiana.

6.5.2.2.1. Método de Difusión en agar.

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la técnica de difusión en agar (Nuñez *et al.*, 1996). Se inició la prueba con la obtención de los sobrenadantes, para lo cual se centrifugó 1.5 mL de cada muestra recolectada a 8000 RPM durante 10 minutos para separar las células del sobrenadante, el cual contiene las bacteriocinas y demás compuestos producidos por las BAL. Los sobrenadantes obtenidos se transfirieron a otro tubo para realizar las pruebas de difusión en agar.

Por otro lado, se realizó la activación de *Listeria monocytogenes* CFQ-103 inoculando el cultivo congelado al 1% v/v en 5 mL de medio BHI, incubándose a 37°C por 24 horas; posteriormente, se tomaron 50 µL de este caldo para inocular 5 mL de caldo BHI estéril e incubar por 6 h a 37°C (esto resulta en un cultivo de *L. monocytogenes* en fase log, con una concentración de 1×10^9 UFC/mL).

Se prepararon placas con medio BHI tamponado (BHI-T), al igual que una sobrecapa del mismo medio (ver anexo 1) donde se inoculó 50 µL de una dilución del cultivo de *Listeria monocytogenes* CFQ-103 (0.5 mL del cultivo en 4.5 mL de solución salina estéril 0.8%). Para montar las placas de BHI-T, sobre las placas de medio sólido (BHI-T) se colocaron, en condiciones asépticas, torres de vidrio estériles para formar los pozos. La sobrecapa se vertió en la placa con el medio y las torres de vidrio puestas. Se retiraron las torres de vidrio y se verificó la formación de los pozos donde se colocaron 80 µL del sobrenadante de cada muestra. Como control positivo se utilizó el sobrenadante de la cepa 33 de *Streptococcus* spp. descrita en un trabajo previo como productora de bacteriocina (Tavera, 2010) y como control negativo se utilizó solución salina estéril al 0.8% (figura 12). Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C, transcurrido este tiempo se midieron los diámetros de los halos de inhibición y se reportaron en milímetros. Esto se realizó por duplicado para cada muestra tomada durante las fermentaciones .

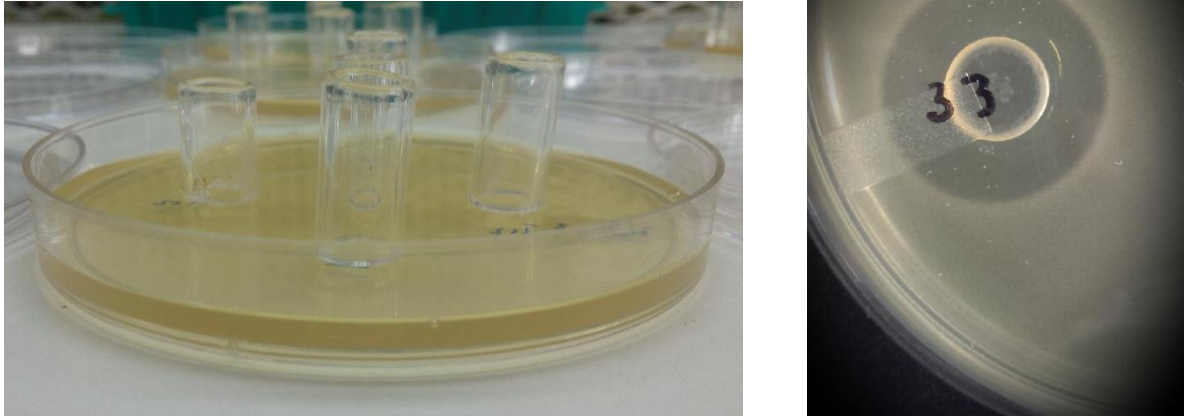


Figura 12. Colocación de torres de vidrio para formar los pozos en la placa BHI-Tamponado (Izquierda). Halo de inhibición de la cepa control (Derecha).

6.5.3. Análisis fisicoquímicos.

6.5.3.1. Determinación de pH.

Para esta evaluación se tomaron muestras bajo condiciones asépticas e inmediatamente se midió el pH con un potenciómetro calibrado (OAKTON pH 700).

6.5.3.2. Cuantificación de azúcares.

La concentración de hidratos de carbono en los medios de cultivo se determinó por los métodos colorimétricos ácido dinitrosalicílico DNS y fenol-sulfúrico. Las muestras colectadas se descongelaron y se centrifugaron a 10,000 RPM por 10 minutos, se separaron los sobrenadantes y se realizaron las diluciones pertinentes para determinar los azúcares presentes en cada tiempo de muestreo.

Para calcular los azúcares reductores en los medios MRS, MCE-1 y MCA-1 se preparó una solución patrón de glucosa al 0.1 % (p/v) para realizar la curva estándar. Se realizaron las diluciones a concentraciones conocidas que fueron de 0.1 a 0.6 mg/mL. De cada concentración se tomó 1 mL y se colocó en un tubo de ensaye, agregándose 1.5 mL del reactivo de DNS (ver anexo 2). Los tubos se

calentaron a baño maría por 5 minutos, enfriándose posteriormente en un baño de hielo. Finalmente se agregaron 5 mL de agua destilada y se homogeneizaron perfectamente. Se procedió a tomar lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Miller, 1959).

Para la determinación de azúcares totales en los medios MCE-2 y MCA-1 se preparó una solución patrón de 1000 µg/mL de glucosa. Se realizaron las diluciones a concentraciones conocidas que fueron de 10 a 100 µg/mL. A 1 mL de cada dilución se le agregó 0.5 mL de una solución de fenol (Sigma) al 80% p/v y se homogenizó en vórtex. En una campana de extracción se agregó directamente sobre la muestra 2.5 mL de ácido sulfúrico concentrado (Merck, Alemania), se homogenizó en vórtex y se llevó a un baño de hielo. Después de 15 min se leyó la absorbancia a 480 nm (Dubois *et al.*, 1956). En el Anexo 2 se muestran las curvas de calibración obtenidas.

En ambos métodos se tomaron alícuotas de las muestras por triplicado para realizar las determinaciones y se leyó en un espectrofotómetro (Genesis 10S UV-VIS) frente a un blanco de reactivos.

6.5.3.3. Cuantificación de proteína de los sobrenadantes.

La cantidad de proteína producida, como una forma indirecta de sugerir la presencia de bacteriocinas en los sobrenadantes (Maldonado, 2016), por la cepa de BAL fue medida por el método de Bradford (1976). Para calcular la concentración de proteínas en las muestras se preparó una solución patrón de 2 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA) para realizar la curva estándar. Se realizaron las diluciones a concentraciones conocidas que fueron de 1.25 a 25 µg/mL.

De cada concentración se tomó 1 mL y se le adicionó 1 mL de colorante, azul de Coomassie del sistema para medición de proteína Quick Start Bio-Rad® Protein Assay en un tubo de ensaye, se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos. Enseguida se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro (Genesis 10S UV-VIS) a una longitud de onda de 595 nm. En el anexo 2 se muestra la curva de calibración obtenida.

Para realizar las mediciones en las muestras de los medios de cultivo MRS, MCA-1 y MCA-2 se realizaron las diluciones pertinentes y se procedió a realizar el ensayo como anteriormente se describió. Como control se cuantificó el contenido proteico en los medios de cultivo sin inocular. Finalmente, la concentración de cada una de las muestras se calculó por interpolación de la absorbancia obtenida en la curva de calibración.

6.6. Estudio del comportamiento de nisina frente a *Listeria monocytogenes*.

Para estudiar el efecto inhibitorio de nisina sobre *L. monocytogenes* se diluyeron 800 mg de *Qualact N: Nisina* en 20 mL de HCl 0.02N, solución stock, con pH cercano a 2.0. El pH se ajustó a 3.0 con NaOH 0.5N y se mantuvo en agitación por 20 minutos. Pasado este tiempo, la solución se filtró a través de una membrana de 0.22 μ (Millipore).

A partir de esta solución madre de nisina y diluyendo en caldo BHI estéril, se prepararon 9 tubos, conteniendo 1 mL de concentraciones de nisina de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 y 80 (mg/mL). Los tubos fueron utilizados inmediatamente para el ensayo de actividad antimicrobiana descrito en la sección 6.5.2.2.1.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Prueba de fermentación de lactosa por las cepas de BAL.

La prueba del uso de la lactosa se realizó con la finalidad de corroborar que las cepas de BAL en estudio tienen la capacidad de fermentar este disacárido, ya que uno de los medios de cultivo que se formularía tendría lactosuero como ingrediente. La figura 13 muestra los resultados obtenidos de la prueba, donde se aprecia que las cuatro cepas evaluadas tienen la capacidad de fermentar dicho carbohidrato por lo que sería posible su crecimiento en un medio de cultivo donde hubiera lactosa como carbohidrato fermentable, como el suero de leche. Tal como se esperaba, la prueba fue negativa para la cepa de *Salmonella* Nitra y positiva para la cepa de *E. coli* 27377 (figura 13).

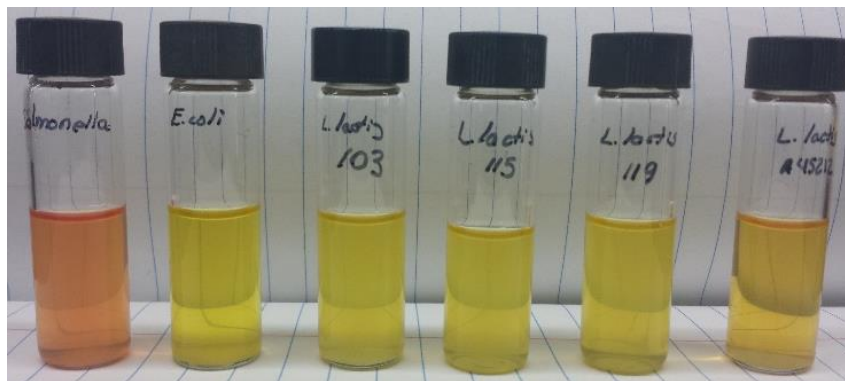


Figura 13. Prueba de uso de la lactosa. Medio: Caldo rojo de fenol con lactosa. Prueba positiva: vire a color amarillo. Prueba negativa: sin cambio de color. De izquierda a derecha: *Salmonella* Nitra (control negativo), *E. coli* (control positivo), *Lactococcus lactis* cepas 103, 115, 119 y A45212.

7.2. Fermentación de cepas de BAL en medio MRS comercial (pH 6.4, 30°C).

Al inicio del presente trabajo, las cuatro cepas de BAL habían sido identificadas como *Lactococcus lactis* (Valderrama, 2012; Díaz-Ruiz et al., 2003). Sin embargo, en un estudio paralelo dentro del grupo de trabajo, se corroboró la identidad de las cepas mediante la comparación de las secuencias del gen rRNA16, teniendo que para el caso de las cepas 119, 103 y 115 aisladas del atole agrio, coincide con la identidad inicialmente descrita como *Lactococcus lactis*, mientras que para la cepa A45212, aislada del pozol, no se encontró concordancia con la identificación previa ya que se describió como *Streptococcus lutetiensis* (Maldonado, 2016).

7.2.1. Crecimiento celular y comportamiento del pH.

Con fines comparativos posteriores y para tener un modelo base, se realizó el cultivo de las cepas 119, 103, 115 y A45212 en medio MRS comercial a pH 6.4 y 30°C. Los resultados presentados en la Figura 14 muestran el crecimiento como el descenso de pH de las cepas 119 y A45212. En ambas se observa un aumento gradual de la cuenta bacteriana desde el inicio de la fermentación, sin embargo cada una entra a la fase estacionaria a distintos tiempos, la cepa A45212 inicia esta fase a la hora 9 mientras que la cepa 119 lo hace desde la hora 12. El crecimiento máximo durante la fermentación se obtuvo después de 12 horas para ambas cepas, después de este tiempo el crecimiento fue más lento. Para el caso de la cepa 119 se tiene que su velocidad específica de crecimiento máxima (μ_{max}) fue de 0.32 h^{-1} y para la cepa A45212 de 0.45 h^{-1} . Teniendo estos valores fue posible comparar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de las cepas de BAL durante las fermentaciones con los medios formulados con lactosuero y melaza de caña.

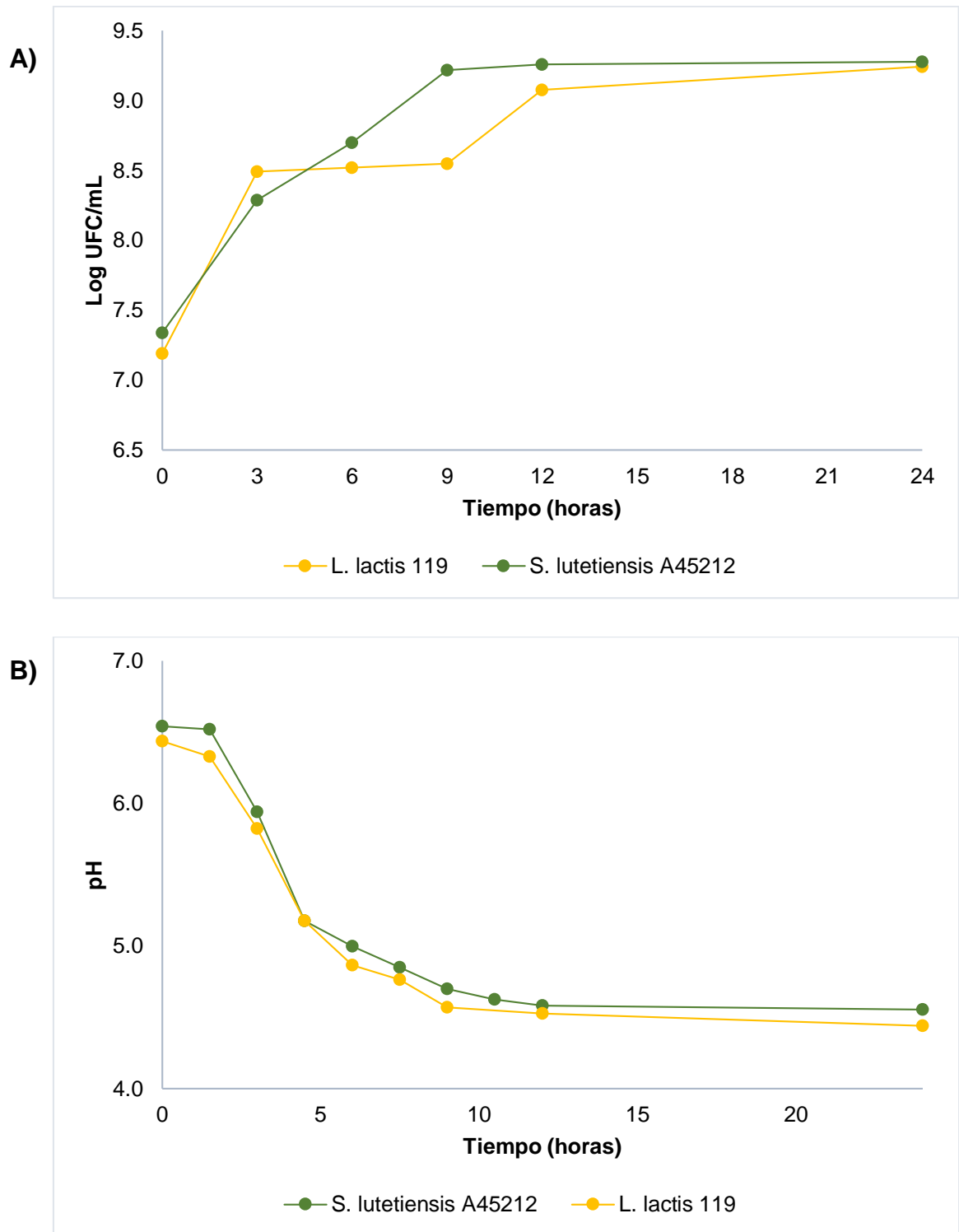


Figura 14. A) Cinéticas de crecimiento de cepas de *Lc. lactis* y *S. lutetiensis* en medio MRS comercial a 30°C y pH 6.4 **B)** Evolución del pH durante la fermentación de cepas de *L. lactis* y *S. lutetiensis* en medio MRS comercial.

En la literatura existen algunos reportes acerca de la velocidad específica de crecimiento máxima de algunas cepas de *Lactococcus lactis* y *Streptococcus* spp. Por ejemplo, Akerberg y colaboradores (1998) realizaron un estudio para modelar la influencia de la concentración de glucosa en la cinética de producción de ácido láctico por *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435, obteniendo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.403 h^{-1} en un medio con harina de trigo a 30°C. Por otro lado, López (2014) realizó la fermentación de una cepa de *Streptococcus* spp. a nivel de matraz en medio MRS, revelando que la $\mu_{\text{máx}}$ promedio de esta BAL es 0.33 h^{-1} , por lo que se observa que la $\mu_{\text{máx}}$ de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* obtenida en el presente trabajo es mayor.

La figura 14B representa el cambio del pH durante las fermentaciones de las cepas de *Lc. lactis* 119 y *S. lutetiensis* A45212; el pH al iniciar la fermentación fue de 6.21 y 6.44, respectivamente; el cual descendió gradualmente con el transcurso de la fermentación hasta valores de 4.52 para la cepa 119 y de 4.44 para la cepa A45212, a las 24 horas del proceso. Parinaz y colaboradores (2012) estudiaron la producción de una bacteriocina de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 aislada de leche de cabra y el efecto que tienen las condiciones atmosféricas de incubación. El medio de cultivo usado para la producción de la bacteriocina fue MRS incubándose a 37°C, al final de la fermentación registraron un valor de pH de 4.6 después de 20 h de incubación en condiciones aerobias; mientras que en condiciones de microaerofilia y capnofilia se alcanzó un pH de 3.9 y 4.1, respectivamente. Se ha encontrado que el estrés oxidativo puede, en general, tener un ligero impacto en el crecimiento de BAL, ya que se definen como microorganismos aerotolerantes, por lo que se han detectado comportamientos diferentes para la producción de bacteriocina en diversas condiciones atmosféricas de incubación (Hirsch, 1951; Cabo *et al.*, 2001; Leroy *et al.*, 2003; Sousa *et al.*, 2010). Por otra parte, Kabuki y colaboradores (2006) evaluaron la actividad inhibitoria y la influencia del medio de cultivo sobre el crecimiento y la producción de bacteriocina de una cepa de *Streptococcus thermophilus* SBT1277 aislada de la leche cruda de vaca. Uno de los medios de cultivo usado para la producción de bacteriocina fue MRS incubándose a 37°C durante 16 h, el pH al final de la

fermentación fue de 4.79, por lo que la cepa de *S. lutetiensis* evaluada disminuye aún más el pH del medio.

7.3. Evaluación del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes.

Las pruebas de actividad antimicrobiana se realizaron en medios BHI amortiguados con la finalidad de tener la seguridad de que la inhibición fuera llevada a cabo por las posibles bacteriocinas y no por la acción de algún ácido orgánico generado por las cepas de BAL (Daba *et al.*, 1991; Rodríguez, 2011). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante la prueba de difusión en agar utilizando a *Listeria monocytogenes* CFQ-103 como microorganismo indicador. En la figura 15 se representan los resultados de los diámetros de los halos de inhibición obtenidos con los sobrenadantes de cada tiempo de fermentación de la cepa de *Lactococcus lactis* 119 y *Streptococcus lutetiensis* A45212. Para el caso de la cepa de *S. lutetiensis* A45212, el rango del diámetro durante la fermentación fue 19-23 mm. Es importante destacar que los halos fueron translúcidos, indicando un efecto bactericida (Tavera, 2010), en todos los tiempos. Para la cepa de *Lc. lactis* 119, durante las primeras 3 horas no se observó inhibición, la cual fue observable hasta las 6 horas con un diámetro 11 mm, mismo que se reportó a las 9 y 12 horas, presentando halos opacos, indicando un efecto bacteriostático. A las 24 horas presentó su máximo de inhibición con un halo 12 mm de diámetro, siendo este translúcido (Figura 16). El grado de inhibición fue inferior al presentado por la cepa A45212. Por lo tanto los resultados de máxima actividad antimicrobiana a las primeras horas de fermentación se relacionan con la producción de bacteriocina, ya que estas se sintetizan durante la fase exponencial de crecimiento (Cotter *et al.*, 2005).

En un trabajo paralelo, Lara (comunicación personal) realizó la fermentaciones de las cepas de *Lactococcus lactis* 103 y 115, así como el ensayo de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* CFQ-103 obteniendo halos de inhibición de 14 y 13 mm, respectivamente a las 6 horas de fermentación, valores inferiores a los obtenidos con la cepa de *S. lutetiensis* A45212.

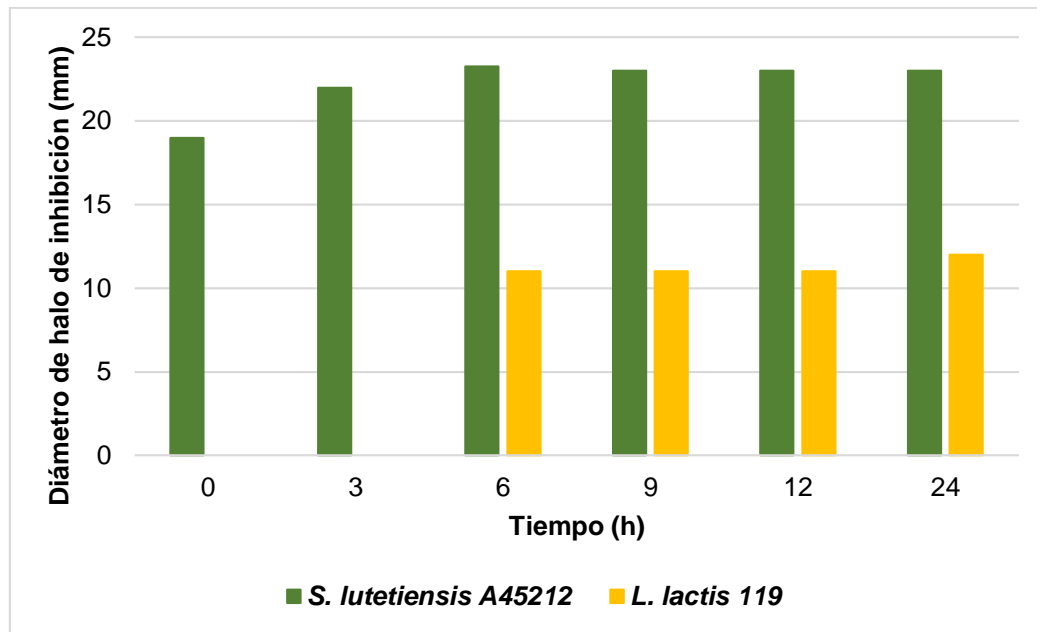


Figura 15. Actividad antimicrobiana frente a *L. monocytogenes* CFQ-103 obtenidos durante el crecimiento de las cepas de BAL A45212 y 119 en el medio MRS comercial a 30°C.

El ensayo de actividad antimicrobiana en las muestras de la fermentación de las cepas de *Lc. lactis* (103,115 ,119) y *S. lutetiensis* A45212 en el medio MRS comercial indicaron que esta última cepa, presentó los mayores diámetros de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* CFQ-103. Por lo tanto, para la continuación de este trabajo se eligió a la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212, ya que fue la que presentó un mayor espectro de inhibición frente al microorganismo indicador.

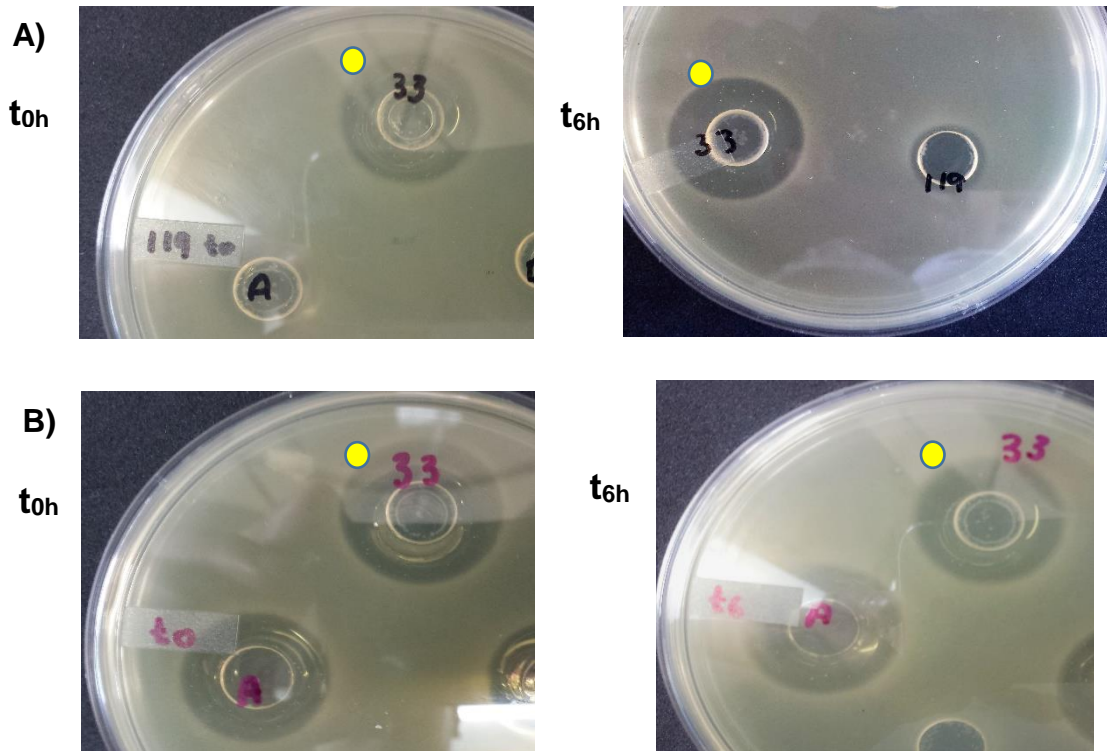


Figura 16. Prueba de difusión en agar (medio BHI amortiguado) de los sobrenadantes de las cepas de BAL a las 0 y 6 horas de fermentación frente a *L. monocytogenes* CFQ-103. A) *Lc. lactis* 119. B) *S. lutetiensis* A45212. En círculo amarillo se indica el halo de inhibición de la cepa control.

7.4. Fermentaciones de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en los medios de cultivo alternativos. Efecto de modificar la concentración de la fuente de carbono de los medios de cultivo.

Se investigaron los efectos de cuatro medios de cultivo (MCE-1, MCE-2, MCA-1 y MCA-2) sobre el crecimiento y la producción de posibles bacteriocinas por *S. lutetiensis* A45212.

7.4.1. Crecimiento celular y comportamiento de pH.

Los resultados cinéticos de *S. lutetiensis* A45212 cultivados sobre medios de cultivo a base de lactosuero y melaza de caña, y MRS se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Rendimientos y cocientes metabólicos para *Streptococcus lutetiensis* A45212 en medios de cultivo comercial y no convencionales.

Parámetro	MEDIO DE CULTIVO				
	LACTOSUERO SUPLEMENTADO			MELAZA DE CAÑA	
	MRS	MCE-1	MCA-1	MCE-2	MCA-2
Rendimiento $Y_{x/s}$ (g g^{-1})	ND	ND	0.2	ND	0.09
Velocidad de crecimiento específica $\mu_{m\acute{a}x}$ (h^{-1})	0.45 ^a	0.51 ^a	0.88 ^b	0.53 ^a	0.68 ^b
Azúcares totales consumidos (%)	39.02	32.16	34.27	54.88	64.22
q_s [g(g células peso seco) ⁻¹ h ⁻¹]	ND	ND	4.52	ND	10.17

$Y_{x/s}$, rendimiento de crecimiento relativo al sustrato; $\mu_{m\acute{a}x}$, velocidad específica de crecimiento; q_s , velocidad específica de consumo de sustrato; ND, no determinado. ^{a,b} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo ($p < 0.05$).

A partir de los resultados cinéticos se puede observar que todos los medios utilizados demostraron ser adecuados para el crecimiento de la cepa de BAL en estudio. En las fermentaciones realizadas, los azúcares se catabolizaron parcialmente y se convirtieron en los productos finales de la vía homofermentativa, ocasionando el descenso del pH del medio (Figura 18).

La figura 17 muestra las cinéticas de crecimiento de la cepa de *S. lutetiensis* en los medios a base de lactosuero y melaza de caña, y se comparan con la cinética obtenida en el medio MRS comercial. Como puede observarse el crecimiento se detuvo después de las 12 h de incubación.

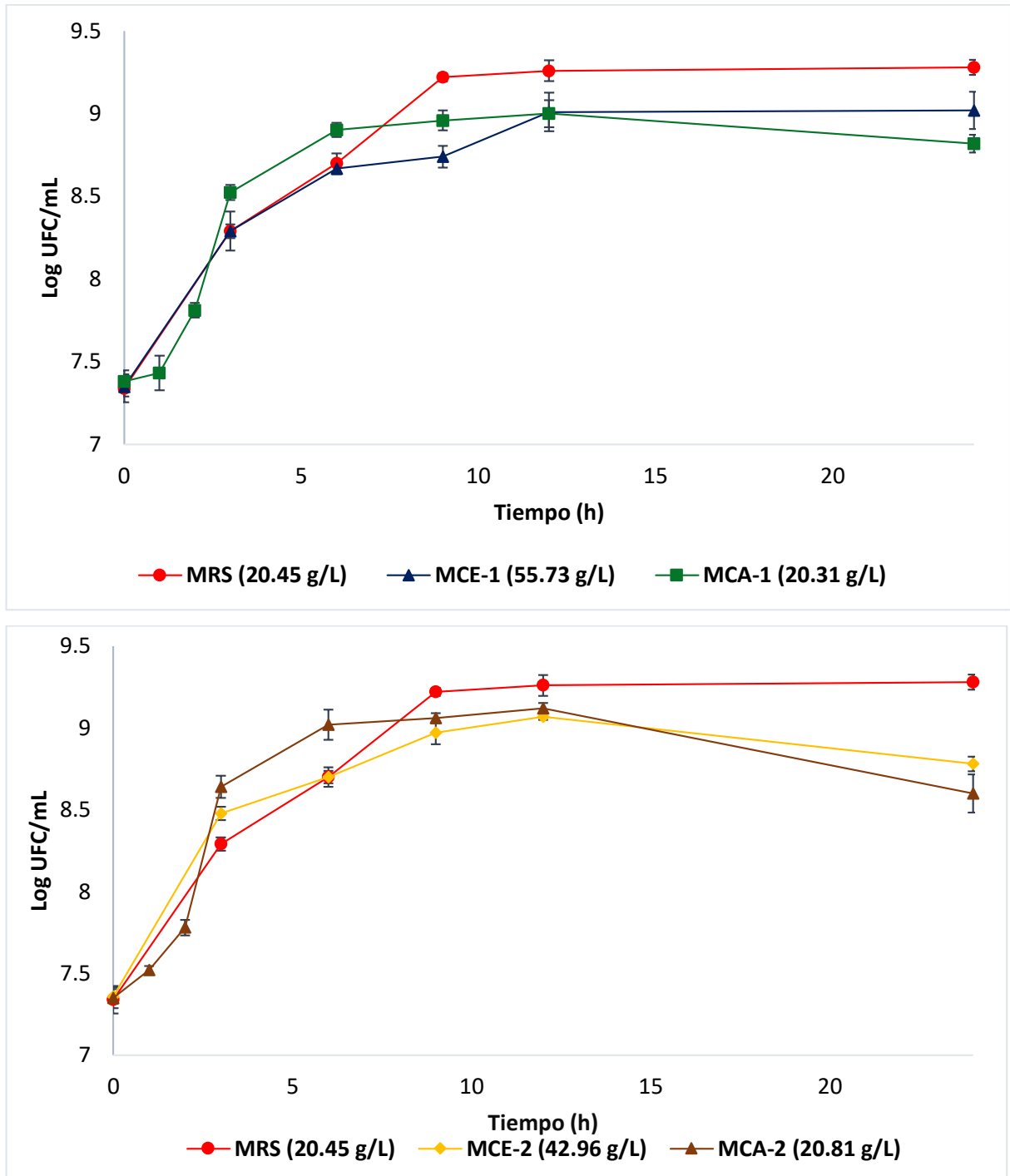


Figura 17. Cultivos de *S. lutetiensis* A45212 en medios MRS, y a base de lactosuero (superior) y melaza de caña (inferior). Los datos reportados son medias \pm desviaciones estándar de dos experimentos y tres replicas. En paréntesis se indica la concentración de la fuente de carbono. **MCE-1**: lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-1**: lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCE-2**: melaza sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2**: melaza con ajuste de la fuente de carbono.

En primer lugar, se hicieron dos fermentaciones con la cepa de *Streptococcus* y dos medios a base de lactosuero suplementado con medio MRS, en uno se añadió la misma cantidad en porcentaje peso volumen de lactosuero y caldo MRS (MCE-1), y en otro cantidades calculadas de lactosuero y caldo MRS para obtener una concentración final de hidratos de carbono de 20 g/L. Como ya se mencionó, para una aplicación exitosa en la industria alimentaria, las bacteriocinas deben producirse a una alta concentración con alta productividad y rendimiento a bajo costo (Guerra y Pastrana, 2003). En este sentido, los medios de cultivos preparados con suero de leche se han utilizado como medios más baratos para la producción, por ejemplo, de nisina (Amiali *et al.*, 1998; Guerra *et al.*, 2001; Guerra y Pastrana, 2003; González *et al.*, 2010). Sin embargo, la producción de esta bacteriocina obtenida en suero de leche (Guerra *et al.*, 2001) ha sido relativamente baja en comparación con los niveles obtenidos en medios complejos, como el MRS (Guerra y Pastrana, 2002), por lo que para optimizar el crecimiento y la producción de bacteriocina en presencia de suero por la cepa A45212, además se adicionó el medio MRS.

La población bacteriana de la cepa A45212 en el medio MCE-1 tuvo un máximo de 9.02 log UFC/mL a las 24 horas. Para el caso del medio MCA-1 se tiene que la máxima población alcanzada fue de 9.0 log UFC/mL a las 12 horas. La $\mu_{\text{máx}}$ obtenida para la cepa A45212 en los medios MCE-1 y MCA-1 fue de 0.51 h⁻¹ y 0.88 h⁻¹, respectivamente. En la producción de sustancias antimicrobianas es importante la estimación de la máxima velocidad de crecimiento en los cultivos microbianos, ya que, como algunos autores sugieren en la literatura, la producción de estas sustancias antimicrobianas está ligada al crecimiento celular debido a que son consideradas como metabolitos primarios (Gobetti *et al.*, 2005; de Arauz *et al.*, 2011; Stoyanova *et al.*, 2012). A pesar de que la glucosa es una fuente de carbono óptima para el crecimiento de cepas de BAL por encima de la lactosa, en las fermentaciones no se describió un crecimiento diaúxico. La diferencia entre las velocidades específicas de crecimiento de estos dos medios puede deberse a un exceso de fuente de carbono lentamente metabolizado (Garries *et al.*, 1997, Guerra

y Pastrana, 2003), dado que en el medio MCE-1 la concentración inicial de hidratos de carbono fue de 55.7 g/L.

En los últimos años, ha habido muchos informes sobre bacteriocinas que son producidas por bacterias ácido lácticas. Sin embargo, en la mayoría de los reportes las bacterias productoras pertenecen a los géneros *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Moll et al., 1999, Ennahar et al., 2000; McAuliffe et al., 2001). La información es limitada sobre el efecto de los nutrientes y las condiciones de crecimiento en la producción de bacteriocina para el género *Streptococcus* en medios suplementados con glucosa o lactosa (Renye et al., 2016). En esta búsqueda, López (2014) realizó la fermentación de una cepa de *Streptococcus* spp. a nivel de matraz en un medio con 50% lactosuero en polvo y 50% MRS para producir sustancias con actividad antimicrobiana, reportando que la $\mu_{\text{máx}}$ promedio de esta BAL fue de 0.40 h^{-1} , valor menor al obtenido en los medios de fermentación a base de lactosuero de este trabajo.

Comparando la cinética (Figura 17) y el valor de la velocidad específica de crecimiento (Tabla 5) entre el medio MRS comercial y los medios de cultivo MCE-1 y MCA-1, se observa que en las primeras 6 horas (fase exponencial) los valores de UFC mL^{-1} obtenidas con estos últimos medios son ligeramente mayores que las obtenidas con el medio MRS, mismo comportamiento se observa con el valor de $\mu_{\text{máx}}$ obtenida entre estos medios. Estas observaciones indican no solo que MCE-1 y MCA-1 resultan adecuados para el desarrollo de *S. lutetiensis* A45212 sino también muestran la conveniencia de añadir MRS al medio.

En la literatura existen algunos reportes acerca de la velocidad específica de crecimiento máxima de algunas cepas productoras de bacteriocinas en medios con lactosuero. Por ejemplo, Piña y colaboradores (2011) realizaron un estudio para evaluar la producción en lote y lote repetido de nisina en biorreactor por *Lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado a pH controlado (5.5, 6.0 y 6.5) adicionando cantidades sub inhibitorias de nisina comercial para promover la sobre-expresión de esta bacteriocina, obteniendo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.86 h^{-1} a 30°C . Las condiciones de fermentación empleadas por Piña y colaboradores fueron diferentes

a las usadas en este trabajo, la fermentación fue realizada en un biorreactor y utilizan nisina dentro de la formulación del medio como inductor. Por lo que es claro que el crecimiento se ve influenciado por factores como composición del medio de cultivo y condiciones de operación (Black y Black, 2012).

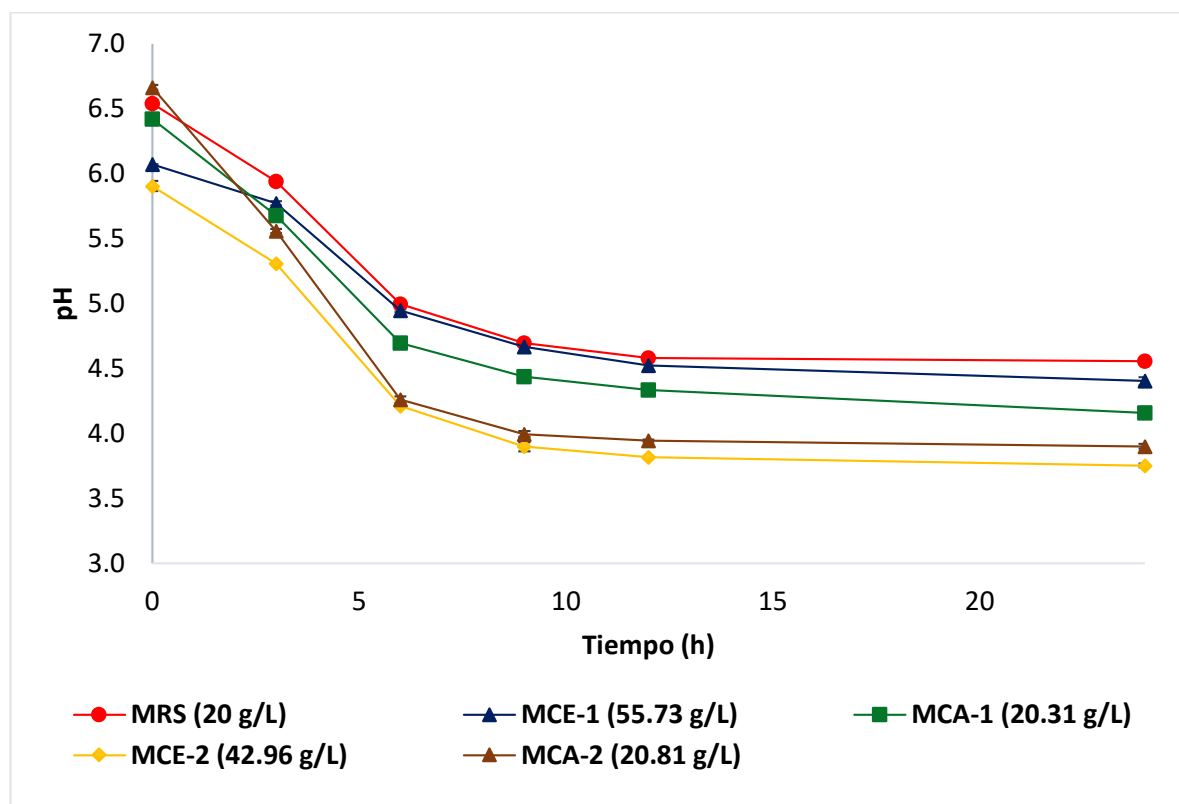


Figura 18. Evolución del pH durante la fermentación de la cepa de *S. lutetiensis* A45212 en medios MRS, y a base de lactosuero y melaza de caña. Los datos reportados son medias \pm desviaciones estándar de dos experimentos y tres replicas. En paréntesis se indica la concentración de la fuente de carbono. **MCE-1:** lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-1:** lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCE-2:** melaza sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2:** melaza con ajuste de la fuente de carbono.

La figura 18 representa el cambio del pH durante las fermentaciones de las cepas de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en los medios MCE-1, MCA-1, MCE-2 y MCA-2; el pH al iniciar la fermentación fue de 6.07, 6.42, 5.91 y 6.67, respectivamente; los cuales descendieron gradualmente con el transcurso de las fermentaciones hasta valores de 4.40, 4.16, 3.75 y 3.90 para cada medio.

Los miembros del género *Streptococcus* son organismos heterótrofos que fermentan azúcares para producir ácido láctico, sin gas, como el producto mayoritario por lo que es lógico esperar un descenso en el pH en el desarrollo de las fermentaciones como resultado principal de la acidificación producida por la liberación de ácido láctico.

Por otro lado, se realizaron dos fermentaciones con la cepa de *Streptococcus* y dos medios de cultivo a base de melaza de caña, en uno se añadió melaza al 4% p/v (MCE-2) y en otro se realizó un ajuste de tal manera que se añadió la cantidad necesaria para obtener una concentración de hidratos de carbono en el medio de 20 g/L (MCA-2). De igual manera se evaluó la diferencia del comportamiento cinético del metabolismo microbiano en función de la fuente de carbono utilizado como sustrato. Es importante señalar que la melaza, que es uno de los subproductos más importantes derivados del proceso de producción de azúcar, rara vez se ha utilizado como sustrato para la producción de bacteriocinas (Todorov *et al.*, 2004; Todorov y Dicks, 2005). El crecimiento de la población en ambos medios tuvo su máximo a las 12 horas de iniciada la fermentación con valores de 9.07 log UFC/mL para MCE-2 y de 9.12 log UFC/mL para MCA-2. En ambas fermentaciones se presentó una disminución del crecimiento a las 24 horas de transcurrida la fermentación. Aunque las BAL son ácido tolerantes pudiendo crecer algunas a valores de pH bajos como 3.2 (Carr y col., 2002), la cepa A45212 presentó cierta susceptibilidad al pH alcanzado a las 24 horas, donde su crecimiento se vio inhibido. Con respecto a lo anterior, en otras cepas de BAL se ha observado lo siguiente, Akerberg y colaboradores (1998) habían reconocido que el efecto inhibitor que produjo el ácido láctico sobre el crecimiento de una cepa de *L. lactis* ATCC 19435 se debió tanto a las formas no disociadas como disociadas del ácido. Estos investigadores también mostraron que este efecto inhibitor dependía del pH del cultivo ya que las concentraciones de ácido láctico que inhibían completamente el crecimiento de la cepa ATCC 19435 eran de 32, 16 y 74 g L⁻¹ a valores de pH constantes de 4, 5 y 6, respectivamente. Sin embargo, Bouguettoucha y colaboradores (2011) indicaron que, para las cepas de *Lactobacillus*, la forma disociada de los ácidos orgánicos produjo un mayor efecto sobre la producción de

biomasa que la forma no disociada. Este diferente efecto se relaciona con la mayor solubilidad de la forma no disociada dentro de la membrana citoplasmática, lo que provoca la acidificación del citoplasma, el colapso de la fuerza motriz y la inhibición del transporte de nutrimentos.

Las $\mu_{\text{máx}}$ obtenidas para la cepa A45212 en los medios MCE-2 y MCA-2 fueron de 0.53 h^{-1} y 0.68 h^{-1} , respectivamente. Aunque la velocidad específica es importante para caracterizar y controlar procesos de fermentación, lamentablemente se encuentran pocos valores reportados por otros autores del crecimiento de cepas de *Streptococcus* en medios a base de melaza de caña. López (2014) realizó la fermentación de una cepa de *Streptococcus* spp. a nivel de matraz en un medio melaza de caña para producir sustancias con actividad antimicrobiana, reportando que la $\mu_{\text{máx}}$ promedio de esta BAL fue de 0.38 h^{-1} , valor menor al obtenido en los medios de fermentación a base de melaza de caña de este trabajo. En la literatura existen algunos reportes donde se estudió la dinámica de la producción de bacteriocinas por una cepa de *Leconostoc mesenteroides* E131 (Metsoviti et al., 2011), donde se utilizó melaza de caña como fuente de carbono. En este trabajo se reportó una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.17 h^{-1} en un medio con melaza a una concentración de 20 g L^{-1} a 25°C y pH de 6.

En resumen, en la tabla 5 se puede ver que los medios MCA-1 y MCA-2 exhibieron $\mu_{\text{máx}}$ mayores, comparadas con las obtenidas en los medios MRS y MCE-1 y MCE-2, lo cual sugiere que el ajuste de la fuente de carbono incrementó la velocidad específica de crecimiento, por lo que se evidencia la conveniencia de obtener la mejor concentración de la fuente de carbono en los medios de fermentación. Posteriormente, se determinó la biomasa en los medios MCA-1 y MCA-2 obteniendo curvas de calibración donde se relacionó el crecimiento celular, $\log \text{ UFC mL}^{-1}$, y el peso seco (g/L) (Figura 19). En estas se calculó la pendiente de cada curva que equivale a una constante (K).

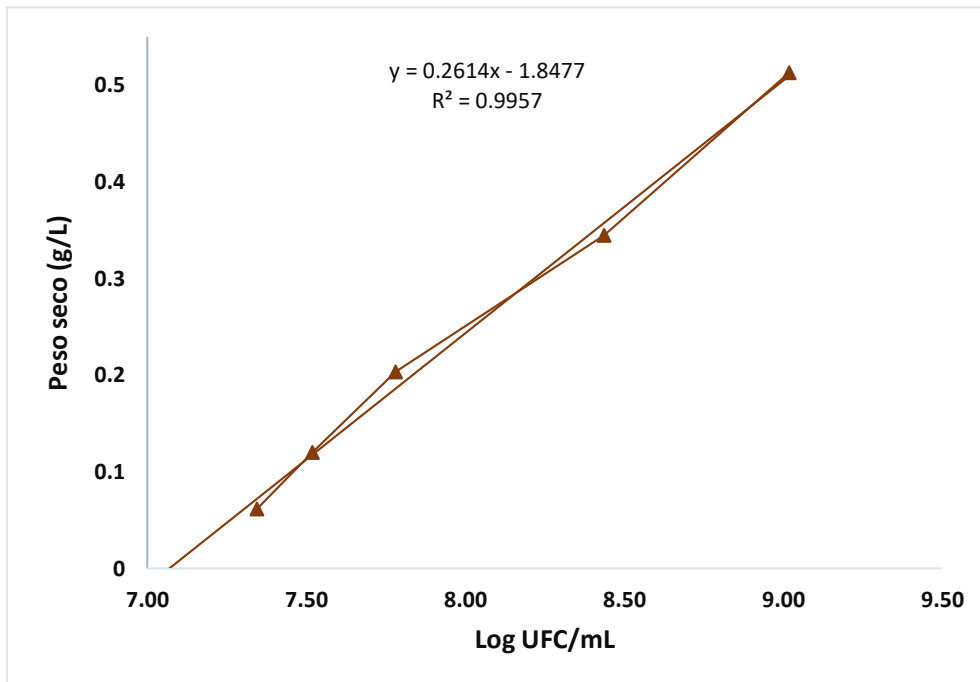
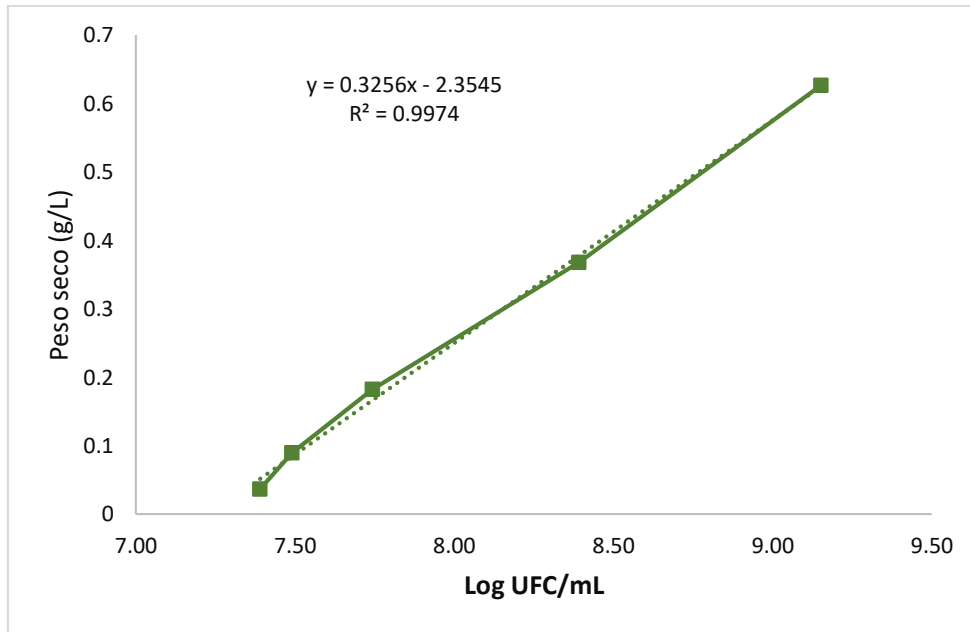


Figura 19. Relación Log UFC/mL vs biomasa medida por peso seco para MCA-1 (superior) y MCA-2 (inferior).

Los rendimientos de biomasa ($Y_{x/s}$) relativos al sustrato fueron de 0.2 para el cultivo en MCA-1, y 0.09 en MCA-2, ambos valores reportados en g de biomasa/g de sustrato. Existen parámetros descritos para bacterias lácticas como *L. lactis* CECT 539 (Costas, 2016), con rendimientos de 0.07 g de biomasa/g de azúcares en un medio a base de lactosuero. De igual forma Metsoviti (2011) reporta un rendimiento para una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* E131 en un medio a base de melaza de caña de 0.07 g de biomasa/g de azúcar consumido. La conversión de energía en biomasa, indicada por los rendimientos de crecimiento relativos al sustrato da mayor eficiencia en la fermentación realizada en el medio MCA-1, a base de lactosuero, dato que coincide con el mayor valor de $\mu_{m\acute{a}x}$.

Se realizó el análisis de varianza (ANEXO 4) para identificar diferencias significativas en el crecimiento y el descenso de pH de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en los cinco medios de cultivo propuestos (MRS, MCE-1, MCA-1, MCE-2 y MCA-2). Los resultados indican que existe diferencia significativa sobre el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de la cepa de BAL y diferencia altamente significativa entre los medios de cultivo evaluados para disminuir el pH. Se realizaron pruebas de rangos múltiples (Duncan) para identificar el medio de cultivo que generó un mayor crecimiento de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 y un mayor descenso de pH. Se obtuvo mejor crecimiento en las fermentaciones con los medios a base de melaza de caña y lactosuero suplementado con MRS, ambos con ajuste de la fuente de carbono, MCA-1 y MCA-2. Pero que el medio MRS da una mejor respuesta en el descenso de pH del medio.

7.4.2. Evaluación de la concentración de la fuente de carbono.

Como se verá en sección 7.5, la fuente de carbono resulta un factor de suma importancia, ya que algunos reportes indican que la máxima producción de bacteriocinas se ve favorecida en concentraciones iniciales de glucosa de 20 g/L (Olvera, 2010). Todorov y Dicks (2005) al tratar de identificar la fuente de carbono para la producción óptima de bacteriocina, concluyeron que con 20g/L de glucosa se daban los mejores resultados de actividad. Es por ello que se realizó el ajuste de

la fuente de carbono de los medios MCE-1 y MCE-2 para obtener los medios MCA-1 y MCA-2 con una concentración inicial a la reportada por Todorov y Dicks (2005).

Para evaluar la concentración de azúcares reductores en los medios MRS, MCE-1 y MCA-1 se empleó el método colorimétrico DNS, mientras que para los medios MCE-2 y MCA-2 se empleó el método Fenol- Sulfúrico. En la figura 20 se presenta el consumo de azúcares totales en los cinco medios de fermentación de la cepa A45212. Es evidente la disminución en la concentración de azúcares conforme avanza el proceso fermentativo, resaltando que el comportamiento no fue el mismo en los medios experimentales.

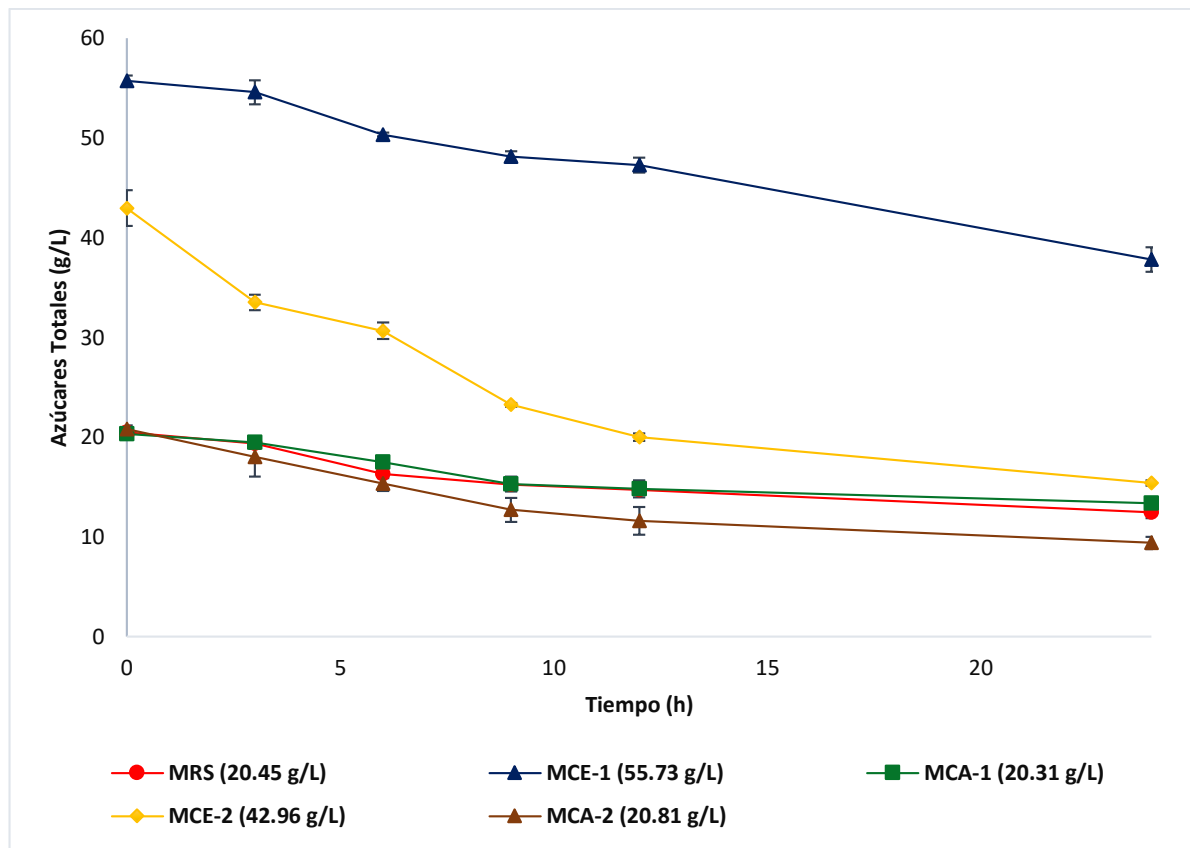


Figura 20. Cinética de consumo de azúcares por parte de *Streptococcus lutetiensis* A45212 creciendo los medios de cultivo evaluados. En paréntesis se indica la concentración de la fuente de carbono. **MCE-1**: lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-1**: lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCE-2**: melaza sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2**: melaza con ajuste de la fuente de carbono.

En la tabla 6 se resumen los datos de las concentraciones de azúcares iniciales, finales y el consumo total durante la fermentación en los medios de cultivo experimentales de la cepa de *Streptococcus* utilizada. En los medios MRS, MCE-1 y MCA-1 se consumieron menos de la mitad de azúcares fermentables, mientras que para el medio MCE-2 y MCA-2 el consumo fue de más de la mitad de los azúcares iniciales. La determinación de azúcares fue de importancia como un indicativo de que las células que se encontraban en el matraz de fermentación estaban en desarrollo, el consumo de este nutrimento indicó el crecimiento del microorganismo y mediante la cuenta de la bacteria se observó que rápidamente entró en fase exponencial. En términos generales, la relación entre el aumento de la población bacteriana y el consumo de azúcares es mayor. En cuanto a la velocidad de consumo, esta fue mayor en los medios MCE-2 y MCA-2 que en los medios MCE-1 y MCA-1 (incluido el medio MRS); esto se puede explicar por la adaptación de la cepa a entornos con altas concentraciones de sacarosa, ya que este microorganismo cuenta con el sistema enzimático para hidrolizar el disacárido y metabolizar luego la glucosa por la vía glicolítica (Salminen, 1993). Mientras que para metabolizar la lactosa, donde el gen responsable del desglose de lactosa (plásmido Lac) codifica las enzimas que transportan la lactosa a la célula (McKay *et al.*, 1976; McKay y Baldwin, 1978; Crow *et al.*, 1983.) para hidrolizarla y generar glucosa y galactosa.

Se determinó la velocidad específica de consumo de sustrato (q_s) en los medios MCA-1 y MCA-2 para representar la velocidad de consumo de la fuente de carbono por unidad de masa celular (Tabla 6). En el medio MCA-1 el consumo de la fuente de carbono durante la fase de crecimiento fue de 34.27% y la velocidad específica de consumo de azúcar fue de 4.52 [g(g células peso seco)⁻¹h⁻¹], mientras que para MCA-2 el consumo fue de 45.12% con una velocidad específica de consumo de 10.17 [g(g células peso seco)⁻¹h⁻¹].

Tabla 6. Concentración de azúcares, consumo total y velocidad de consumo en los medios experimentales por *Streptococcus lutetiensis* A45212.

Medio de Cultivo	Concentración inicial de azúcares (g/L)	Concentración final de azúcares (g/L)	Consumo total de azúcares (g/L)	Velocidad de consumo (g/L*h)
MRS	20.45±0.48	12.47±0.59	7.98	0.69 ^a
MCE-1	55.73±0.52	37.81±1.24	17.92	0.89 ^d
MCA-1	20.31±0.58	13.35±0.17	6.96	0.57 ^b
MCE-2	42.96±1.78	15.37±0.27	27.60	0.91 ^c
MCA-2	20.81±0.37	9.39±0.62	11.42	1.46 ^a

MCE-1: lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-1:** lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCE-2:** melaza sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2:** melaza con ajuste de la fuente de carbono. ^{abcd} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo ($p < 0.05$).

A pesar de los resultados obtenidos, realizado el análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el consumo de la fuente de carbono de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en los cinco medios de cultivo propuestos (MRS, MCE-1, MCA-1, MCE-2 y MCA-2), se vio que existe diferencia altamente significativa en el consumo de la fuente de carbono por efecto del tipo de sustrato y realizada las prueba de rangos múltiples, Duncan (Anexo 4); para identificar el medio de cultivo que generó el mayor cambio en el consumo de la fuente de carbono, se vio que la mejor respuesta se obtuvo con el medio a base de lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono (MCE-1) y que los medios a base de melaza de caña con ajuste de la fuente de carbono (MCA-2) y MRS resultan estadísticamente muy semejantes.

7.5. Evaluación del efecto antimicrobiano de los sobrenadantes producidos por la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en los medios de cultivo alternativos.

La producción de sustancias con actividad antimicrobiana por la cepa A45212 en los medios MCE-1, MCA-1, MCE-2 y MCA-2 se realizó de acuerdo a la metodología descrita en la sección 6.4.1; posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana por la técnica de difusión en agar usando a *Listeria monocytogenes* CFQ-103 como indicador.

En la figura 21 se muestra la evolución de la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* CFQ-103 de los sobrenadantes de la cepa A45212 crecida en medios a base de lactosuero, melaza de caña y MRS. En general, los medios elaborados a base de residuos agroindustriales fueron capaces de soportar el crecimiento bacteriano y la producción de antimicrobianos por la cepa de BAL ensayada. Fue evidente que la cepa secretó diferentes cantidades de posibles bacteriocinas según el medio de cultivo utilizado, pero la simple capacidad de poder producir estos metabolitos da evidencia de la habilidad de *S. lutetiensis* A45212 de utilizar estos sustratos como fuente de carbono.

Se destacan diferencias importantes de actividad entre los sustratos, para el medio MCE-1, el máximo valor del diámetro de halo de inhibición se alcanzó a las 6 horas de proceso, siendo este de 21 mm; de igual forma el valor máximo obtenido en el medio MCA-1 fue de 22 mm de diámetro en el halo de inhibición a las 6 horas. Para los medios MCE-2 y MCA-2, los valores máximos de diámetros de inhibición fueron de 19 mm a las 9 horas y de 23 mm a las 12 horas, respectivamente; por lo que el medio de cultivo influyó en la producción de posibles bacteriocinas. En todos los medios de cultivo los halos obtenidos fueron translúcidos indicando un efecto bactericida (Figuras 22 y 23).

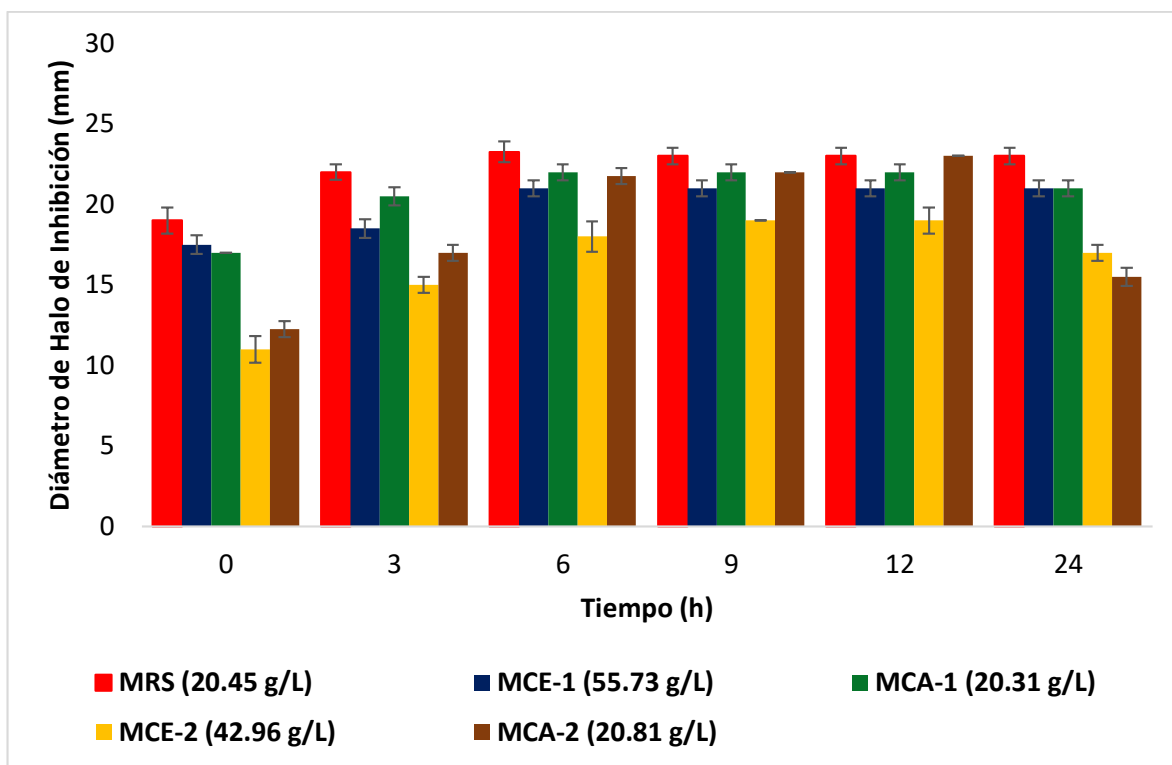


Figura 21. Evolución de la actividad antimicrobiana de posibles bacteriocinas de *S. lutetiensis* A45212 en los medios formulados usando a *Listeria monocytogenes* CFQ-103 como microorganismo indicador. En paréntesis se indica la concentración de la fuente de carbono. **MCE-1:** lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-1:** lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCE-2:** melaza sin ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2:** melaza con ajuste de la fuente de carbono.

Como se observa en la figura 21, las mayores actividades antimicrobianas se registraron después de las 6 horas de fermentación o después de este tiempo, siendo notablemente mayores las exhibidas en el medio MRS y MCA-1. Como se mencionó anteriormente, la producción de sustancias antimicrobianas está relacionada con el crecimiento del microorganismo, lo cual se observa claramente, ya que conforme avanza el tiempo de fermentación la producción de estas sustancias se incrementa, viéndose favorecida la actividad antilisteria. Sin embargo, en el caso de los medios MCE-2 y MCA-2 la actividad antimicrobiana disminuye considerablemente con sobrenadantes obtenidos a las 24 horas de iniciada la

fermentación. Se ha informado de una disminución de la actividad bactericida durante la fase de crecimiento estacionaria de la cepa productora. Esto se ha atribuido a varios mecanismos, como la agregación de proteínas, degradación proteolítica por una enzima específica o inespecífica, y la adsorción a células productoras (De Vuyst y Vandamme, 1992; Parente *et al.*, 1994). Otros autores proponen diversas razones para explicar el cese del crecimiento y la producción de bacteriocinas: (i) el agotamiento de la fracción de proteínas fácilmente asimilables por la cepa de BAL, debido al efecto de su consumo y extracción de muestras (Guerra y Pastrana, 2003; Guerra *et al.*, 2001, 2007), (ii) el agotamiento de algún micronutriente (vitamina o mineral) o aminoácido esencial para el crecimiento de la bacteria (De Vuyst, 1995) y/o (iii) a la acumulación de ácido láctico en el medio, como se explicó en la sección 7.4.1 (Akerberg *et al.*, 1998; Bouguettoucha *et al.*, 2011).

Como se esperaba, la producción óptima, observada en el mayor espectro de inhibición, se vio en el medio MRS después de las 6 horas de incubación, ya que este medio contiene componentes que influyen en la producción de bacteriocina en otras especies de BAL, como lo son la proteosa peptona No. 3, polisorbato 80, fosfato dipotásico y sulfato de manganeso (Cheigh *et al.*, 2002; Todorov *et al.*, 2012, 2013). De igual manera se observó algo similar en el medio MCA-1, ya que a las 6 horas se presentó el mayor espectro de inhibición, la producción de bacteriocina fue estimulada usando lactosuero en polvo suplementado con medio MRS con el ajuste correspondiente. El efecto del tipo y concentración inicial de azúcar sobre la producción de bacteriocina ha sido demostrado y reportado (Metsoviti, 2011). Las fuentes de carbono se pueden dividir en aquellos que aumentan el crecimiento y los que mejoran la producción de bacteriocina (Biswas, *et al.*, 1991; Cheigh *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2006). En este trabajo, los medios con glucosa (MRS) y donde se suplemento a través de la adición de caldo MRS (MCE-1 y MCA-2) se favoreció la acumulación de posibles bacteriocinas en el medio de cultivo, mientras que la melaza (MCE-2 y MCA-2) en mayor medida favoreció la producción de biomasa.

Por otra parte, el efecto inhibitorio que las altas concentraciones de fuente de carbono ejercen sobre el crecimiento y la producción de posibles bacteriocinas podrían deberse a la inhibición del sustrato o también asociarse a la regulación de la fuente de carbono en la síntesis o en las modificaciones de los precursores, como ocurre con la nisina (De Vuyst, 1995; Guerra et al., 2001). Para evitar este efecto inhibitorio de las altas concentraciones de la fuente de carbono en la producción de posibles bacteriocinas se realizó el ajuste de la fuente de carbono. Metsoviti (2011) reporta que para una cepa de *Leuconostoc mesenteroides* E131, la cinética de la biomasa no aumentó significativamente cuando se incrementó la concentración inicial de melaza en el medio (de 20 a 30 g/L), pero la concentración de bacteriocina aumentó significativamente, por lo que para algunas cepas el tener un exceso de la fuente de carbono puede resultar óptimo. Sin embargo, para cultivos discontinuos de *L. lactis* CECT 539 (Costas et al., 2016) se observó un efecto inhibitorio cuando se incrementó la concentración de glucosa en la suplementación de lactosuero para la producción de nisina.

Renye y colaboradores (2016) realizaron un estudio para determinar si diversos medios de cultivo, entre ellos M17 suplementado con 0.5% de lactosa y MRS, alterarían la producción de bacteriocinas por cepas de *Streptococcus thermophilus*. Los resultados presentados muestran halos de inhibición máximos de 15.2 mm en el medio M17 con lactosa a las 24 h y de 14 mm en MRS al mismo tiempo de incubación. Los resultados obtenidos del ensayo de actividad antimicrobiana de la cepa de *S. lultetiensis* A45212 son considerablemente mayores que los descritos previamente.

Guerra y colaboradores (2001) estudiaron el comportamiento cinético de la producción de bacteriocinas por cepas de *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 539 en suero de leche. Los resultados muestran que el medio fue capaz de soportar el crecimiento y la producción de bacteriocina, y que las máximas producciones fueron obtenidas a las 12 h, después de ese tiempo las tasas de producción fueron más lentas, mientras que la cepa de BAL estudiada en el presente trabajo presentó una máxima actividad antilisteria a las 6 horas en los medios MRS, MCE-1 y MCA-1.

Los resultados previos indican que la complementación con medio MRS, que contiene glucosa como fuente de carbono, produce una mayor estimulación en la producción de posibles bacteriocinas. Esto fue observado también por Costas y colaboradores (2016), cuando la producción de nisina se realizó en cultivos discontinuos usando suero suplementado con distintas concentraciones de glucosa para seleccionar el mejor medio de fermentación para una cepa de *Lactococcus lactis* CECT 539. Se mostró la conveniencia de añadir los suplementos de glucosa en los medios de cultivo ya que se obtuvieron mayores rendimientos de $Y_{Nis/X}$ en el cultivo con suero de leche cuando se suplementó con glucosa.

De igual forma, como en los demás parámetros evaluados, se realizó el análisis de varianza (ANEXO 4) para identificar diferencias significativas del efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana. Se obtuvo diferencia altamente significativa entre los cinco medios de cultivo probados. Se realizó la prueba de rangos múltiples (Duncan) para determinar el medio de cultivo con el cual se obtuvo el mayor espectro de inhibición frente a *Listeria monocytogenes*. Se encontró la mayor actividad antimicrobiana con el medio MRS, lo cual era de esperarse ya que el medio fue utilizado como referencia y está reportado que es el medio que promueve un abundante crecimiento y niveles relativamente altos de bacteriocina. Sin embargo los medios a base de melaza de caña y lactosuero, ambos con ajuste de la fuente de carbono (MCA-1 y MCA-2), mostraron buenos resultados, comportamiento que se correlaciona con el crecimiento ya que son los que muestran la mayor $\mu_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, habría que analizar el impacto del factor tiempo, ya que la mayor actividad, y quizás también la mayor producción de sustancias antimicrobianas en el medio MCA-1, se obtiene a las 6 horas de fermentación, mientras que en el medio MCA-2, ocurre a las 12 horas.

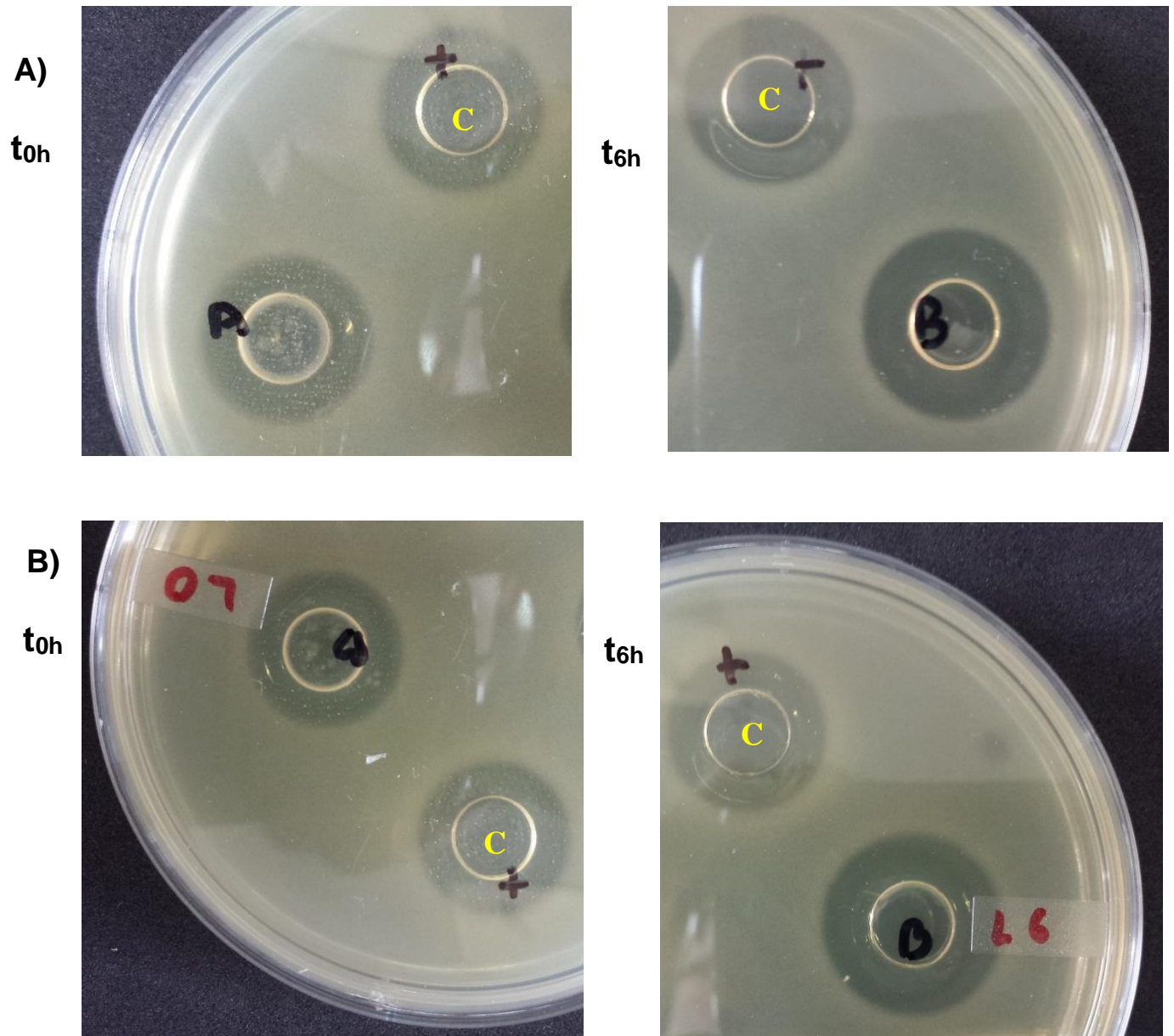


Figura 22. Prueba de difusión en agar (medio BHI amortiguado) de los sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 cultivada en medios MCE-1 (A) y MCA-1 (B) a las 0 y 6 horas de fermentación frente a *L. monocytogenes* CFQ-103. En letra amarilla se indica el halo de inhibición de la cepa control.

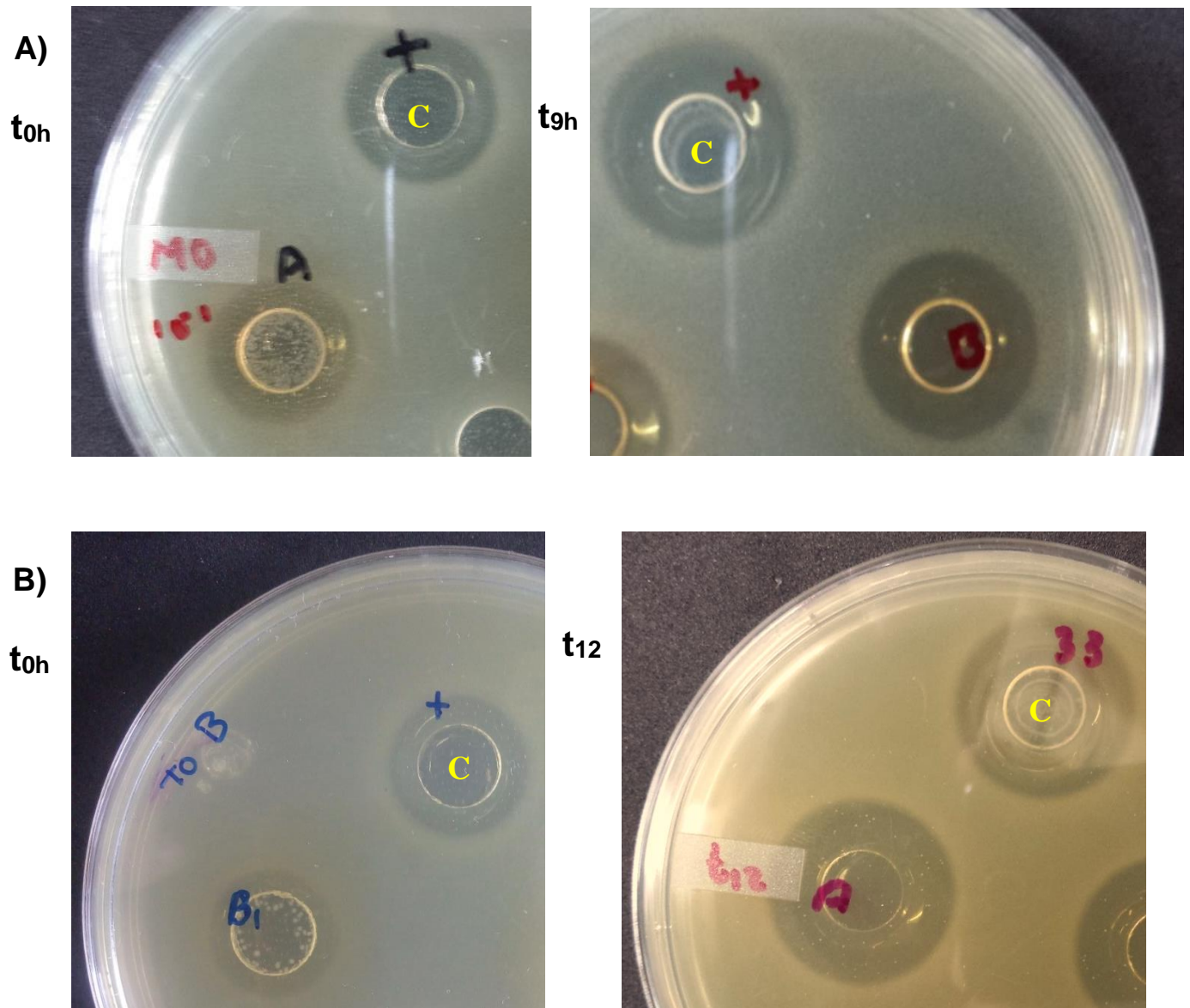


Figura 23. Prueba de difusión en agar (medio BHI amortiguado) de los sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 cultivada en medios MCE-2 (A) a las 0 y 9h, y MCA-2 (B) a las 0 y 12 horas de fermentación frente a *L. monocytogenes* CFQ-103. En letra amarilla se indica el halo de inhibición de la cepa control.

7.6. Cuantificación de proteína.

Dado que en los medios MCA-1 y MCA-2 se observaron las mayores actividades antimicrobianas, observaciones corroboradas con el análisis estadístico, se cuantificó la cantidad de proteína en estos medios. En la figura 24 se representan las concentraciones de proteína de cada uno de los sobrenadantes producidos a diferentes tiempos por la cepa *Streptococcus lutetiensis* A45212, en los medios MRS, MCA-1 y MCA-2.

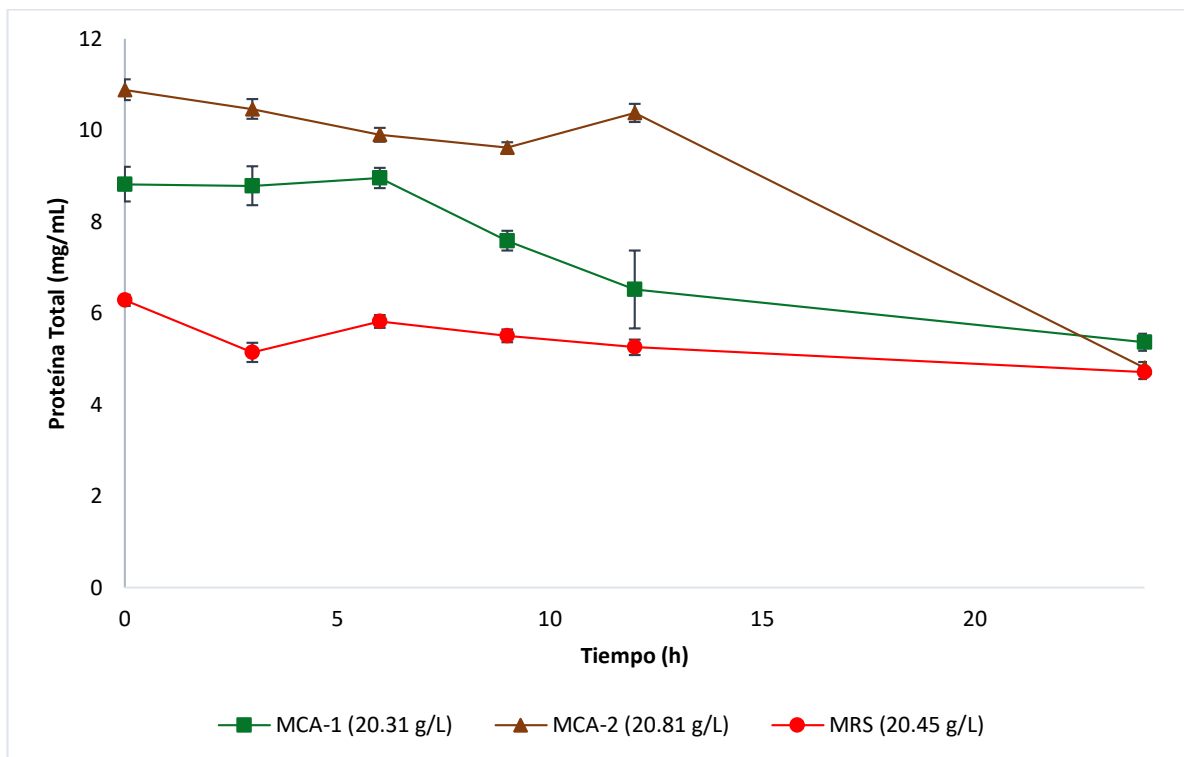


Figura 24. Determinación de proteínas por método de Bradford en los sobrenadantes del medio de crecimiento de la cepa *S. lutetiensis* A45212 en los medios MRS y alternativos seleccionados. En paréntesis se indica la concentración de la fuente de carbono. **MCA-1:** lactosuero suplementado con ajuste de la fuente de carbono; **MCA-2:** melaza con ajuste de la fuente de carbono.

Como se puede observar, la concentración de proteína presente en los sobrenadantes de los 3 medios es diferente. Las diferencias podrían deberse a varias razones: la influencia del medio de cultivo en la síntesis de proteínas o la concentración de proteína perteneciente a cada medio (Olvera, 2010). Los niveles de este nutrimento disminuyeron en las primeras horas de fermentación, debido a su consumo por la cepa de BAL, sin embargo en los tres casos se observan aumentos de las cantidades de proteínas a determinados tiempos. Estos aumentos coinciden con los tiempos a los cuales la cepa de *Streptococcus* registró las mayores actividades antimicrobianas frente a *L. monocytogenes* CFQ-103, por lo que fue en estos lapsos, pertenecientes a la fase exponencial, cuando se produjo la mayor cantidad de posibles bacteriocinas. Con estos resultados, se muestra que los medios de cultivo probados favorecieron la síntesis de proteínas, entre ellas, probablemente, las posibles bacteriocinas.

7.7. Estudio del comportamiento de nisina frente a *Listeria monocytogenes*.

Mediante un ensayo de actividad antimicrobiana con diluciones seriadas de nisina (Nisaplin N: nisina) se buscó establecer una relación entre la concentración que inhibiese a *L. monocytogenes* CFQ-103 con el halo de inhibición que genera. Se realizaron tres experimentos con tres replicas cada uno, en todos los casos se observó la formación de halos definidos y translúcidos (figura 25).

Como se aprecia en la tabla 7, el efecto de la nisina dependió de las concentraciones de esta. La nisina fue efectiva con las concentraciones estudiadas, sin embargo mediante múltiples repeticiones se vio que los halos de inhibición generados no aumentaban a concentraciones superiores de 80 mg mL⁻¹, por lo que, probablemente, la cepa de *Listeria* evaluada sea resistente a esta bacteriocina comercial (Vignolo et al., 2000) o en la formulación comercial haya presentes otros componentes distintos a la bacteriocina disminuyendo su eficacia.

Tabla 7. Diámetros de halos de inhibición frente a *L. monocytogenes* a distintas concentraciones de nisina por el método de difusión en agar.

Concentración (mg/mL)	Diámetro de halo de inhibición (mm)
5	13
10	14
20	14.5
30	15
40	15.5
50	16
60	16.5
70	17
80	18

Comparando estos resultados con los obtenidos del ensayo de actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 en los medios alternativos evaluados, se hubiera esperado que el efecto antimicrobiano de la nisina comercial, al ser una sustancia purificada, fuera más drástico; sin embargo esto no fue así. Se consideró establecer la relación entre la concentración de nisina comercial con los diámetros de halo de inhibición generados y asociar los resultados de la actividad antimicrobiana de este trabajo con una concentración aproximada de nisina comercial, sin embargo, esto no fue posible ya que los valores de los diámetros de halo de inhibición generados por los sobrenadantes de la cepa de BAL en cada uno de los medios alternativos fue mayor al intervalo de diámetros de inhibición obtenidos con el ensayo de nisina. De esto podemos observar que la actividad de las posibles bacteriocinas de *S. lutetiensis* A45212 en los medios de cultivo ensayados resultó más efectiva frente a *Listeria monocytogenes* CFQ-103 que la del producto comercial, por lo que se esperaba que su actividad antimicrobiana aumentara considerablemente una vez aplicado los procedimientos de purificación, dando evidencia del gran uso potencial de las posibles bacteriocinas de esta cepa de BAL a nivel industrial.

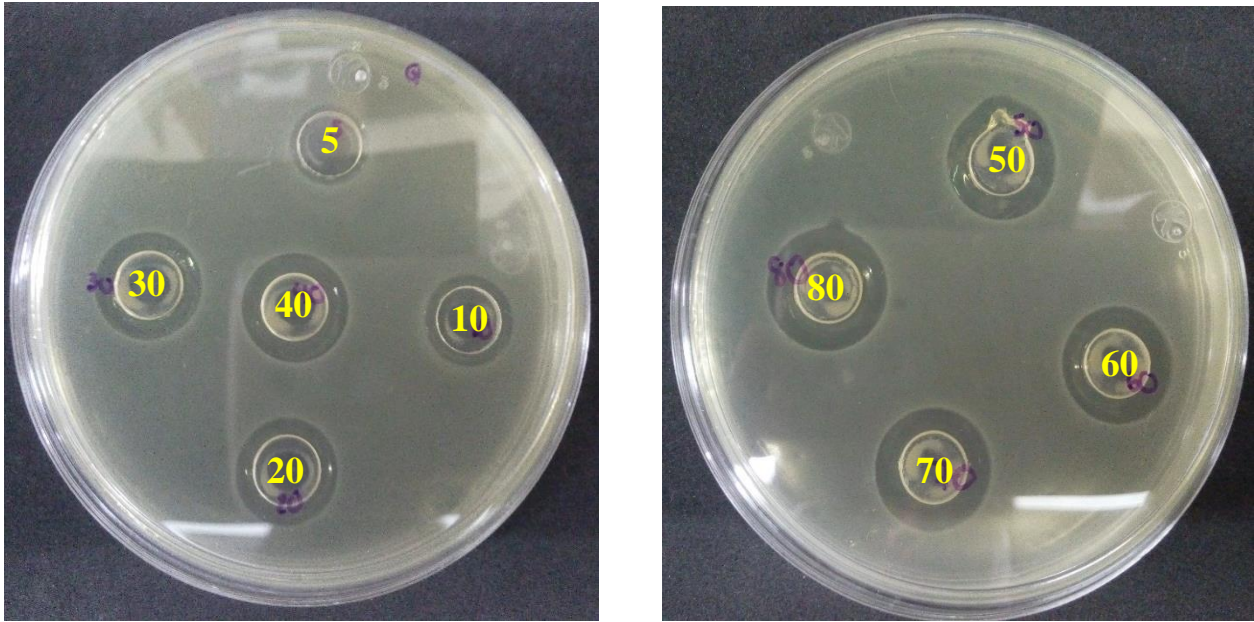


Figura 25. Inhibición de distintas concentraciones de nisina comercial contra *Listeria monocytogenes*.

Se utilizaron azúcares baratos procedentes de la industria láctea y azucarera como fuentes de carbono para el cultivo de *Streptococcus lutetiensis* A45212 evaluando el comportamiento cinético así como la producción de posibles bacteriocinas. Por un lado, este trabajo representa un enfoque en el que se llevó a cabo la biovalorización de compuestos de bajo costo para la producción de metabolitos de valor añadido útiles para la industria alimentaria. Los resultados de este estudio demuestran el beneficio de utilizar residuos agroindustriales para la producción rentable de bacteriocinas para sustituir otro tipo de compuestos usados actualmente, sin embargo las evaluaciones tecnoeconómicas serán las encargadas de determinar la viabilidad real de ambas perspectivas con el fin de desarrollar procesos baratos y eficientes para la producción a gran escala de bacteriocinas para su uso en la industria de alimentos. Por otro, se da evidencia de que esta posible bacteriocina, producida por una cepa de BAL proveniente de un alimento fermentado tradicional mexicano, es una opción atractiva como conservador natural para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados, ya que posiblemente tenga una mejor actividad antimicrobiana que la nisina que actualmente se comercializa (Qualact N: nisina).

8. CONCLUSIONES

- Los medios alternativos propuestos a base de lactosuero y melaza de caña soportaron tanto el crecimiento de *S. lutetiensis* A45212 como la producción de sustancias con actividad antimicrobiana.
 - El medio MRS comercial confirmó ser el ideal para el desarrollo de *S. lutetiensis* A45212 y la producción de sustancias antimicrobianas.
 - Con base en el análisis estadístico, los medios MCA-1 y MCA-2 representan una opción viable para producir biomasa y sustancias antimicrobianas, por lo que existe la posibilidad de sustituir los medios convencionales, haciendo los procesos más baratos.
-

9. PERSPECTIVAS

- Realizar la purificación y caracterización de las posibles bacteriocinas producidas por *S. lutetiensis* A45212 en estos medios de cultivo alternativos.
 - Analizar el efecto de otros factores tales como la temperatura y el pH sobre el crecimiento y la producción de sustancias antimicrobianas por *S. lutetiensis* A45212 en estos medios para tener un conocimiento más detallado del proceso fermentativo.
 - Llevar el estudio al siguiente nivel, en biorreactor, para sentar las bases tecnológicas para la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por *S. lutetiensis* A45212, y darle una aplicación comercial.
 - Ahondar más en la dinámica de producción de posibles bacteriocinas de esta cepa de BAL, y seguir explorando más materiales de desecho para la producción de bio moléculas que reduzcan la contaminación ambiental.
-

10. ANEXOS

Anexo 1

A. Medios de cultivo

1. Medio BHI amortiguado (placa y sobrecapa)

Medio utilizado en la prueba de difusión en agar. El fosfato monobásico y el fosfato dipotásico mantienen la estabilidad del pH en el medio.

Tabla A.1. Medio BHI amortiguado (placa)

Compuesto	g/L
BHI (OXOID®)	37
Agar bacteriológico (BD Bacto®)	17
Fosfato monobásico de potasio (J. T. BAKER®)	4.3
Fosfato dipotásico (J. T. BAKER®)	10

Tabla A.2. Medio BHI amortiguado (sobrecapa)

Compuesto	g/L
BHI (OXOID®)	15
Agar bacteriológico (BD Bacto®)	8
Fosfato monobásico de potasio (J. T. BAKER®)	4
Fosfato dipotásico (J. T. BAKER®)	10

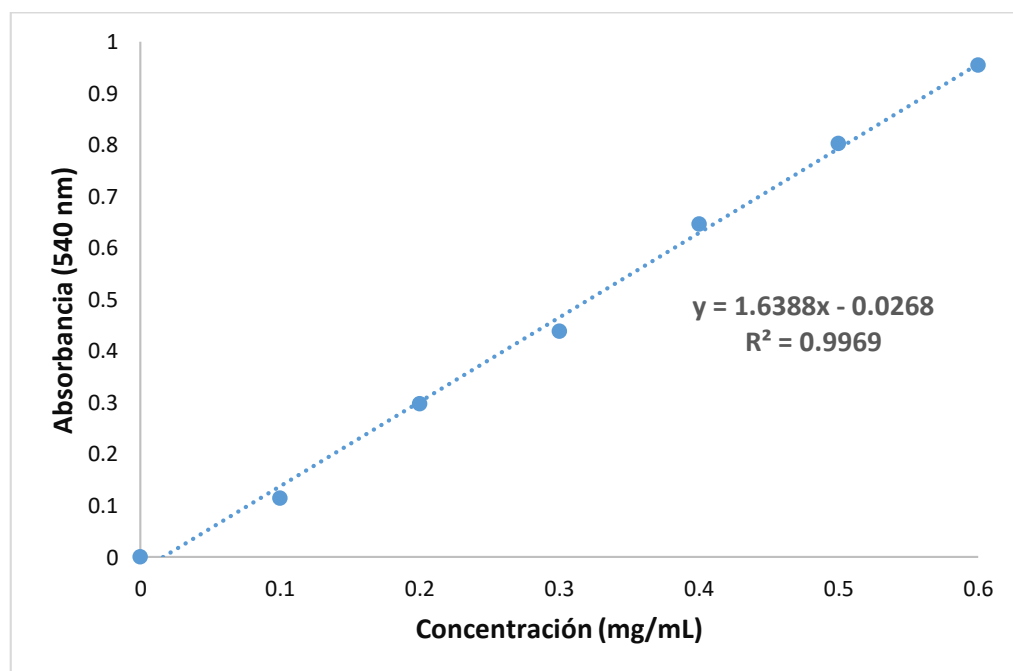
Anexo 2

A. Preparación del reactivo de DNS

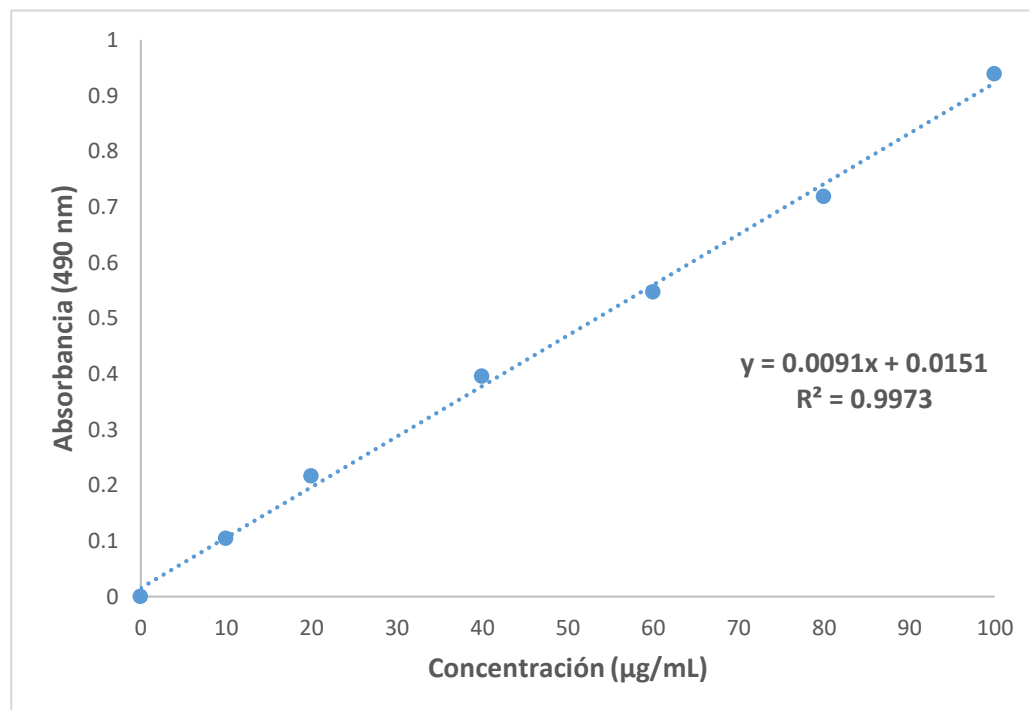
El reactivo de DNS se preparó de la siguiente manera: en un vaso de precipitados de 1000 mL se disolvieron 3.75 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico y 50 g de tartrato de sodio y potasio en 350 mL de agua agitando constantemente. Posteriormente la solución preparada se mezcló con 7 g de NaOH, 2.7 g de fenol y 2.95 g de metabisulfito de sodio. La solución se vertió a un matraz aforado de 500 mL y se aforo con agua destilada hasta completar el volumen total. El reactivo se guardó en un frasco color ámbar para su protección de la luz.

B. Curva Patrón de glucosa

B.1. Método de DNS (azúcares reductores)



B.2. Método Fenol- Sulfúrico (azúcares totales)



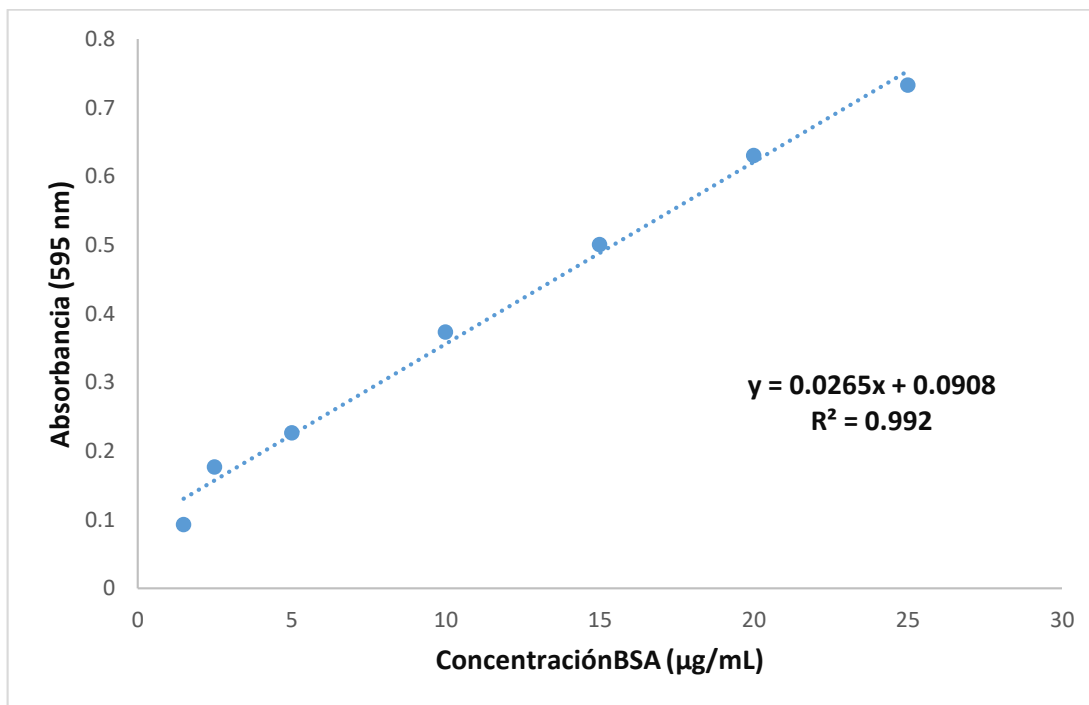
C. Determinación de proteína mediante el método de Bradford

Fundamento: Este método depende de la interacción relativamente inespecífica entre un colorante hidrofóbico (azul brillante de coomasie G-250) y las proteínas en sus residuos básicos y aromáticos. Hay un cambio en el máximo de absorción del colorante de 465 a 595 nm, pasando de un color rojo a azul, y es este aumento en la absorción a 595 nm el que se mide (Bradford, 1976). Es relativamente sensible a la presencia de contaminantes tales como restos de detergente y líquidos orgánicos como el metanol. Su principal ventaja es que resulta más rápido y fácil de emplear que otros métodos alternativos.

C.1. Curva patrón de Bradford

Se utilizó el microensayo estándar de diluciones para obtener la curva patrón de Bradford partiendo de un stock de albumina de suero bovino (BSA) Bio-Rad® estándar de 2 mg/mL. Se realizaron las diluciones a concentraciones conocidas

que fueron de 1.25 a 25 $\mu\text{g/mL}$. Las preparaciones se realizaron por triplicado y se leyó la absorbancia de cada solución en el espectrófotometro Genesis 10S UV-VIS a 595 nm y se obtuvo la curva patrón.



Anexo 3

Tabla A.3. Datos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MRS.

Tiempo (h)	Log UFC/mL	pH	Azúcares Totales (g/L)	Actividad antimicrobiana Diámetro de halo de inhibición (mm)	Proteína (mg/mL)
0	7.28 ± 0.084	6.54 ± 0	20.45 ± 0.476	19 ± 0.816	6.28 ± 0.125
3	8.29 ± 0.041	5.94 ± 0.012	19.33 ± 0.507	22 ± 0.479	5.14 ± 0.207
6	8.65 ± 0.059	5.00 ± 0.010	16.31 ± 0.463	23.3 ± 0.645	5.82 ± 0.141
9	9.21 ± 0.025	4.70 ± 0.005	15.23 ± 0.586	23 ± 0.5	5.50 ± 0.140
12	9.23 ± 0.063	4.58 ± 0.010	14.67 ± 0.410	23 ± 0.5	5.25 ± 0.166
24	9.24 ± 0.045	4.56 ± 0.006	12.47 ± 0.588	23 ± 0.5	4.71 ± 0.146

Nota: los valores obtenidos son el promedio de dos fermentaciones con dos replicas cada una ± desviación estándar.

Tabla A.4. Datos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MCE-1 (Lactosuero suplementado con MRS sin ajuste de la fuente de carbono).

Tiempo (h)	Log UFC/mL	pH	Azúcares Totales (g/L)	Actividad antimicrobiana Diámetro de halo de inhibición (mm)
0	7.35 ± 0.060	6.07 ± 0	55.73 ± 0.520	18 ± 0.577
3	8.29 ± 0.118	5.77 ± 0.010	54.57 ± 1.202	19 ± 0.577
6	8.67 ± 0.035	4.95 ± 0.040	50.34 ± 0.183	21 ± 0.5
9	8.74 ± 0.067	4.67 ± 0.024	48.14 ± 0.521	21 ± 0.5
12	9.01 ± 0.116	4.52 ± 0.013	47.26 ± 0.739	21 ± 0.5
24	9.02 ± 0.113	4.40 ± 0.015	37.81 ± 1.240	21 ± 0.5

Nota: los valores obtenidos son el promedio de dos fermentaciones con dos replicas cada una ± desviación estándar.

Tabla A.5. Datos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MCA-1 (Lactosuero suplementado con MRS con ajuste de la fuente de carbono).

Tiempo (h)	Log UFC/mL	pH	Azúcares Totales (g/L)	Actividad antimicrobiana Diámetro de halo de inhibición (mm)	Proteína (mg/mL)	Biomasa (g/L)
0	7.38 ± 0.065	6.42± 0	20.31 ± 0.583	17 ± 0	8.82 ± 0.382	0.04 ± 0.014
1	7.43 ± 0.104	---	---	---	---	0.09 ± 0.014
2	7.81 ± 0.043	---	---	---	---	0.18 ± 0.042
3	8.52 ± 0.046	5.68±0.005	19.45 ± 0.336	21 ± 0.577	8.78 ± 0.425	0.37 ± 0.014
6	8.90 ± 0.043	4.70±0.005	17.49 ± 0.482	22 ± 0.5	8.96 ± 0.221	0.63 ± 0.014
9	8.96 ± 0.061	4.44±0.005	15.29 ± 0.757	22 ± 0.5	7.58 ± 0.217	0.92 ± 0.219
12	9.00 ± 0.082	4.34±0.006	14.79 ± 0.863	22 ± 0.5	6.52 ± 0.855	1.33 ± 0.021
24	8.82 ± 0.053	4.16±0.005	13.35 ± 0.168	21 ± 0.5	5.37 ± 0.187	---

Nota: los valores obtenidos son el promedio de dos fermentaciones con dos replicas cada una ± desviación estándar.

Tabla A.6. Datos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MCE-2 (Melaza de caña sin ajuste de la fuente de carbono).

Tiempo (h)	Log UFC/mL	pH	Azúcares Totales (g/L)	Actividad antimicrobiana Diámetro de halo de inhibición (mm)
0	7.36 ± 0.045	5.91 ± 0.040	42.96 ± 1.778	11 ± 0.816
3	8.48 ± 0.041	5.31 ± 0.010	33.51 ± 0.769	15 ± 0.5
6	8.70 ± 0.039	4.21 ± 0.005	30.65 ± 0.816	18 ± 0.957
9	8.97 ± 0.069	3.90 ± 0.015	23.23 ± 0.166	19 ± 0
12	9.07 ± 0.022	3.82 ± 0.035	19.99 ± 0.375	19 ± 0.816
24	8.78 ± 0.045	3.75 ± 0.010	15.37 ± 0.270	17 ± 0.500

Nota: los valores obtenidos son el promedio de dos fermentaciones con dos replicas cada una ± desviación estándar.

Tabla A.7. Datos obtenidos de la fermentación de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MCA-2 (Melaza de caña con ajuste de la fuente de carbono).

Tiempo (h)	Log UFC/mL	pH	Azúcares Totales (g/L)	Actividad antimicrobiana Diámetro de halo de inhibición (mm)	Proteína (mg/mL)	Biomasa (g/L)
0	7.35 ± 0.064	6.67±0.017	20.81± 0.374	12.3 ± 0.5	10.88±0.229	0.065±0.035
1	7.52 ± 0.025	---	---	---	---	0.12±0.028
2	7.78 ± 0.048	---	---	---	---	0.2±0.064
3	8.64 ± 0.068	5.56±0.026	18.01± 1.957	17 ± 0.5	10.46±0.216	0.35±0.007
6	9.02 ± 0.092	4.26±0.008	15.33± 0.760	22 ± 0.5	9.90±0.152	0.51±0.078
9	9.06 ± 0.029	4.00±0.006	12.69± 1.207	22 ± 0	9.92±0.113	0.72±0.064
12	9.12 ± 0.032	3.95±0.006	11.58± 1.386	23 ± 0	10.38±0.201	0.98±0.247
24	8.6 ± 0.117	3.90±0.012	9.39± 0.618	16 ± 0.577	4.80±0.134	---

Nota: los valores obtenidos son el promedio de dos fermentaciones con dos replicas cada una ± desviación estándar.

Anexo 4

Análisis estadístico

ANOVA, utilizando el programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS 10.0 para Windows)

Tabla A8. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la disminución de pH considerando las variables: medios de cultivo (MRS, MCE-1, MCE-2, MCE-3, MCE-4) y fermentaciones realizadas (2 fermentaciones en cada medio).

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas (α)		Interpretación
					0.05	0.01	
Medios	2.207	4	0.552	2128.673	3.18	5.21	**
Fermentación	0.002	1	0.002	7.715	4.67	9.07	*
Repeticiones	8×10^{-5}	1	8×10^{-5}	0.309	4.67	9.07	NS
Error	0.003	13	0				
Total	2.213	19					

*Diferencia significativa ($P < 0.05$)

**Diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

NS No hay diferencia significativa ($P > 0.05$)

MCE-1 Medio con lactosuero suplementado con MRS SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-2 Medio con lactosuero suplementado con MRS CON ajuste de la fuente de carbono, MCE-3 Medio con melaza de caña SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-4 Medio con melaza de caña CON ajuste de la fuente de carbono

La evidencia indica que hay diferencia altamente significativa en el análisis de varianza entre los medios de cultivo evaluados para disminuir el pH, entre las mismas fermentaciones realizadas en cada medio existe diferencia significativa. Por otro lado, no existe evidencia suficiente que sugiera interacción entre las variables utilizadas. Para un mejor análisis se requiere ampliar el número de repeticiones. Se realizaron las pruebas de rangos múltiples (prueba de Duncan) para determinar el medio de cultivo con el que se obtuvo la mayor disminución de valor de pH.

Tabla A9. Prueba de Duncan para la comparación del efecto de los medios de cultivo en la disminución de pH

Clasificación con el paquete SPSS	
Medio de Cultivo	Interpretación
Melaza sin ajuste	4.21±0.0 ^a
Melaza con ajuste	4.26±0.008 ^b
LS con ajuste	4.70±0.005 ^c
LS sin ajuste	4.95±0.040 ^d
MRS	4.99±0.010 ^e

abcde Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo. LS lactosuero

El paquete reportó 5 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar el medio de cultivo con el cual se obtuvo un mayor disminución de los valores de pH se consideró el medio de cultivo donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra e. Así se concluye que la mejor respuesta se obtuvo con el medio MRS.

Tabla A10. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el consumo de hidratos de carbono considerando las variables: medios de cultivo (MRS, MCE-1, MCE-2, MCE-3, MCE-4) y fermentaciones realizadas (2 fermentaciones en cada medio).

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas (α)		Interpretación
					0.05	0.01	
Medios	3577.854	4	894.463	1978.942	3.18	5.21	**
Fermentación	1.21	1	1.21	2.678	4.67	9.07	NS
Repeticiones	0.05	1	0.05	0.111	4.67	9.07	NS
Error	5.876	13	0.452				
Total	3584.99	19					

*Diferencia significativa (P<0.05)

**Diferencia altamente significativa (P<0.01)

NS No hay diferencia significativa (P>0.05)

MCE-1 Medio con lactosuero suplementado con MRS SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-2 Medio con lactosuero suplementado con MRS CON ajuste de la fuente de carbono, MCE-3 Medio con melaza de caña SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-4 Medio con melaza de caña CON ajuste de la fuente de carbono

Los resultados indican que hay diferencia altamente significativa en el análisis de varianza del consumo de la fuente de carbono por efecto del medio de cultivo, sin que haya diferencia significativa entre las fermentaciones y las repeticiones. Para un mejor análisis se requiere ampliar el número de repeticiones. Se llevó a cabo la prueba de rango múltiple (Duncan) para identificar el medio de cultivo que generó el mayor cambio en el consumo de la fuente de carbono.

Tabla A11. Prueba de Duncan para la comparación del consumo de la fuente de carbono en los diferentes medios de cultivo.

Clasificación con el paquete SPSS	
Medio de Cultivo	Interpretación
Melaza con ajuste	15.33±0.76 ^a
MRS	16.31±0.65 ^a
LS con ajuste	17.49±0.31 ^b
Melaza sin ajuste	30.65±1.11 ^c
LS sin ajuste	50.34±0.23 ^d

^{abcd} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo.
LS lactosuero

El paquete reportó 4 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo registrado. Así, para identificar el medio de cultivo con el cual se obtuvo el mayor consumo de la fuente de carbono por parte de la cepa de BAL se consideró el medio donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra d. Así se concluyó que la mejor respuesta se obtuvo con el medio a base de lactosuero suplementado sin ajuste de la fuente de carbono. Con base en este parámetro, los medios a base de melaza de caña con ajuste de la fuente de carbono y MRS resultan estadísticamente muy semejantes.

Tabla A12. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en el crecimiento de la cepa de BAL considerando las variables: medios de cultivo (MRS, MCE-1, MCE-2, MCE-3, MCE-4) y fermentaciones realizadas (2 fermentaciones en cada medio).

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas (α)		Interpretación
					0.05	0.01	
Medios	0.212	4	0.053	4.374	3.06	4.89	*
Error	0.182	15	0.012				
Total	0.393	19					

*Diferencia significativa ($P < 0.05$)

**Diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

NS No hay diferencia significativa ($P > 0.05$)

MCE-1 Medio con lactosuero suplementado con MRS SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-2 Medio con lactosuero suplementado con MRS CON ajuste de la fuente de carbono, MCE-3 Medio con melaza de caña SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-4 Medio con melaza de caña CON ajuste de la fuente de carbono

Los resultados indican que hay diferencia significativa en el análisis de varianza del efecto del medio de cultivo en el crecimiento de la cepa de BAL. Se llevó a cabo la prueba de rango múltiple (Duncan) para identificar el medio de cultivo que generó un mayor crecimiento de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212.

Tabla A13. Prueba de Duncan para la comparación del crecimiento en los diferentes medios de cultivo.

Clasificación con el paquete SPSS	
Medio de Cultivo	Interpretación
LS sin ajuste	8.66±0.035 ^a
MRS	8.69±0.065 ^a
Melaza sin ajuste	8.70±0.039 ^a
Melaza con ajuste	8.84±0.228 ^b
LS con ajuste	8.89±0.041 ^b

^{ab} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo. LS lactosuero

El paquete reportó 2 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo y para identificar el medio de cultivo que dio lugar a un mayor crecimiento de la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 se consideró el medio donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra b. Así se concluye que el mayor crecimiento se dio en las fermentaciones con los medios a base de melaza de caña y lactosuero suplementado, ambos con ajuste de la fuente de carbono.

Tabla 14. Análisis de varianza para identificar diferencias significativas en la actividad antimicrobiana considerando las variables: medios de cultivo (MRS, MCE-1, MCE-2, MCE-3, MCE-4) y fermentaciones realizadas (2 fermentaciones en cada medio).

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G. L.	Cuadrado medio	F calculada	F tablas (α)		Interpretación
					0.05	0.01	
Medios	50.5	4	12.625	84.167	3.18	5.21	**
Fermentación	0.05	1	0.05	0.333	4.67	9.07	NS
Repeticiones	1.25	1	1.25	8.333	4.67	9.07	*
Error	1.95	13	0.15				
Total	53.75	19					

*Diferencia significativa ($P < 0.05$)

**Diferencia altamente significativa ($P < 0.01$)

NS No hay diferencia significativa ($P > 0.05$)

MCE-1 Medio con lactosuero suplementado con MRS SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-2 Medio con lactosuero suplementado con MRS CON ajuste de la fuente de carbono, MCE-3 Medio con melaza de caña SIN ajuste de la fuente de carbono, MCE-4 Medio con melaza de caña CON ajuste de la fuente de carbono

La evidencia indica que hay diferencia altamente significativa en el análisis de varianza del efecto del medio de cultivo en la actividad antimicrobiana y no existe diferencia entre las fermentaciones. Por otro lado se presenta diferencia significativa entre las repeticiones. Se realizó la prueba de rangos múltiples (Duncan) para determinar el medio de cultivo con el cual se obtuvo el mayor espectro de inhibición frente a *Listeria monocytogenes* por efecto del medio del cultivo.

Tabla A15. Prueba de Duncan para la comparación de la actividad antimicrobiana en los diferentes medios de cultivo.

Clasificación con el paquete SPSS	
Medio de Cultivo	Interpretación
Melaza sin ajuste	18.5±0.035 ^a
LS sin ajuste	20.75±0.065 ^b
Melaza con ajuste	21.75±0.039 ^c
LS con ajuste	22±0.228 ^c
MRS	23.25±0.041 ^d

^{abcd} Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre los medios de cultivo. LS lactosuero

El paquete reportó 4 grupos. Para su identificación se asignó una letra diferente a cada grupo. Para identificar el medio de cultivo con el cual se obtiene la mayor actividad antimicrobiana se consideró el medio de cultivo donde termina el último grupo, el cual corresponde a la letra d. Así se concluye que la mayor actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* se obtiene con el medio MRS, lo cual era de esperarse ya que el medio fue utilizado como referencia y esta reportado que es el medio que promueve un abundante crecimiento y niveles relativamente altos de bacteriocina. Sin embargo los medios los medios a base de melaza de caña y lactosuero, ambos con ajuste de la fuente de carbono, muestran buenos resultados, comportamiento que se correlaciona con el crecimiento ya que son los que muestran un óptimo crecimiento.

11. Literatura Citada

- Abbasiliasi S., Ramakrishnan RN, Ibrahim TAT, et al. 2011. Effect of medium composition and culture condition on the production of bacteriocin-like inhibitory substances (blis) by *Lactobacillus paracasei* LA07, a strain isolated from BUDU. *Biotechnol Biotec Eq*, 25, 2652–2657.
- Abee T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiology Letters*, 129: 1-10.
- Abee T., Klaenhammer T. R. and Letellier L. 1994. Kinetic studies of Lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that form poration complex in the cytoplasmic membrane. *Appl. Env. Microbiol.* 60 (3): 1006-1013.
- Akerberg C., Hofvendahl K., Zacchi G., Hanh-Hagerdal B. 1998. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour. *Appl Microbiol Biotechnol.* 49: 682-690.
- Amiali M. N., Lacroix C., Simard R. E. 1998. High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World J Microbiol Biotechnol* 14:887–894.
- Arrojo B., Omil F., Garrido J. M., Méndez R. 2003. Combinación de un filtro anaerobio y un sistema SBR para el tratamiento de las aguas generadas en un laboratorio de análisis de productos lácteos. *Afinidad* 60(506):344-354.
- Axelsson L. 2006. *Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology*. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. Third Edition. Editorial Board.
- Babel F. J. 1977. Antibiosis by lactic cultures bacteria. *J Dairy Sci.*, 60: 815-821.
- Barakat R. K., Griffiths M. W., Harris L. J. 2000. Isolation and characterization of *Carnobacterium*, *Lactococcus* and *Enterococcus* sp. from cooked, modified atmosphere packaged, refrigerated, poultry meat. *Int. J. Food Microbiol.* 62:83-94.
-

- Barefoot, S. F., Klaenhammer, T. R. 1984. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 1808-1815.
- Basanta R., García Delgado M. A., Cervantes Martínez, J. E., Mata Vázquez H., Bustos Vázquez G. 2007. Sostenibilidad del reciclaje de residuos de la agroindustria azucarera: una revisión. Ciencia y Tecnología Alimentaria, Julio, 293-305.
- Berry E. D., Liewen M. B., Mandigo R. W. y Hutkins R. W. 1990. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semidry sausage. J. Food Prot., 53: 194-197.
- Bibbins M. M. 1992. Speed up lactic acid bacteria. M. Sc. Thesis. Department of Food Science and Technology, University of Reading. 83 pages.
- Biswas S. R., Ray P., Johnson M. C., Ray B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, Pediocin ACh, by *Pediococcus acidilactici*. Appl. Environ. Microbiol. 57, 1265–1267.
- Black J. G., Black L. J. 2012. Microbiology: Principles and explorations, 8th/Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Blackburn P, de la Harpe J. 1998. Moist bacteriocin disinfectant wipes and methods of using the same. US Patent 5, 762, 948.
- Bouguettoucha A., Balannec B., Amrane A. 2011. Unstructured models for lactic acid fermentation—a review. Food Technol Biotechnol 49: 3–12.
- Boulnois G. J., Paton G. C., Mitchell T. J. y Andrew P.W. 1991. Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxins of *Streptococcus pneumoniae*. Mol. Microbiol., 5: 2611-2616.
- Bradford M. M. 1976. Rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem Vol. 72, pp. 248-254.
- Britz T. J., Van Schdkwyk C., Hung Y. T. 2006. Treatment of dairy processing waste water. In: Waste Treatment in the Food Processing Industry. Yapijakis, C., Hung, Y.T., Lo, H.H. and Wang, L.K. (Eds). CRC Press, New York, pp. 1-28.
-

- Bruno M. E. C., Montville T. J. 1993. Common mechanistic action of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 59: 3003-3010.
- Cabo M. L., Murado M. A., Gonzalez M.P., Pastoriza L. 2001. Effects of aeration and pH gradient on nisin production. A mathematical model. *Enzyme and Microb Tech.* 29: 264–273.
- Carr F. J., Chill D., Maida N. 2002. The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol.* 28(4): 281-370.
- Casp V. A. y Requena J. A. 1999. *Procesos de Conservación de Alimentos*, Colección de Tecnología de Alimentos. Eds Mundi-Prensa, Madrid España pp. 97-98.
- Castañeda G., Eslava C., Castro N., León J., Chaidez C. 2014. Listeriosis en México: importancia clínica y epidemiológica. *Salud Pública de México*, 56(6), 654-659.
- Charles A. 1998. *Ciencia de la Leche, Principios de la Técnica Lechera*. Eds Continental, México pp. 267-302.
- Cheigh C., Choi H., Park H., Kim S., Kook M., Kim T., Hwang J., Pyun Y. 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *J Biotechnol* 95:225-235.
- Chikindas M. L., García M. J., Driesessen A. J. M., Ledebøer A. M., Nissen J., Nes I. F., Abee T., Konings W. N., Venema G. 1993. PediocinPA-1, a Bacteriocin from *Pediococcus acidilactici* PAC1.0 Forms Hydrophilic Pores in the Cytoplasmic Membrane of Target Cells. *Appl Environ Microbiol* 59: 3577-3584.
- Cintas L. M., Casaus M. P., Herranz C., Nes I. F., Hernández P. E. 2001. Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Food Science and Technology International*, 74: 281- 305.
- Cladera-Olivera F., Caron G. R., Brandelli A. 2004. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. *Biochem Eng J* 21:53–58.
-

- CONADESUCA. Informe estadístico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en México, Zafras 2016-2007/2015-2015.
- ContraPunto. 01 de Junio del 2016. Reportan nuevo derrame de melaza. [En línea]. Disponible en <http://www.contrapunto.com.sv/sociedad/ambiente/reportan-nuevo-derrame-de-melaza/847> (ultimo acceso 05 de agosto de 2017).
- Costas M., Alonso E., Pérez N. 2016. Nisin production in realkalized fed-batch cultures in whey with feeding with lactose- or glucose-containing substrates. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:7899-7908.
- Cota-Navarro C. B. Carrillo-Reyes J., Davila-Vazquez G., Alatraste-Mondragón F., Razo-Flores E. 2011. Continuous hydrogen and methane production in a two-stage cheese whey fermentation system. *Water Sci Technol* 64:367–374.
- Cotter P. D., Hill C., Ross R. P. 2005. Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol* 3: 777–788.
- Crow V. L., Davey G. P., Pearce L. E., Thomas T. D. 1983. Plasmid linkage of the D-tagatose 6- phosphate pathway in *Streptococcus lactis*: effect on lactose and galactose metabolism. *J Bacteriol* 153: 76-83.
- Daba H., Pandian S., Gosselin J. F., Huang J., Lacroix C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol.* 57 (12), 3450-3455.
- Dellaglio F., de Roissart H., Torriani S., Curk M. C., Janssens D. 1994. Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En *Bactéries Lactiques*. H. de Roissart y F.M. Luquet (eds.). Vol. I. pp. 25-116. Loriga. Uriage, La France.
- De Arauz L. J., Jozala A. F., Baruque-Ramos J., Mazzola P. G., Pessoa A., Penna T. C. V. 2011. Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology*, 62: 419-426.
- De Vuyst L. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. *J Appl Bacteriol* 78:28–33.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *J General Microbiol* 138, 571-578.
-

- De Vuyst L., Vandamme E. J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications. London, Blackie Academic & Professional, pp. 91-142, Chap. 3.
- Díaz-Ruiz G. 2003. Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de Doctorado. Fac. Química. UNAM. 127 páginas.
- Díaz-Ruiz G., Guyot J. P., Ruiz-Terán F., Morlon J., y Wachter C. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Appl Environ Microbiol.* 69(8): 4367-4374.
- Dragone G., Mussatto S. I., Almeida e Silva J. B., Teixeira J. A. 2011. Optimal fermentation conditions for maximizing the ethanol production by *Kluyveromyces fragilis* from cheese whey powder. *Biomass Bioenerg* 35:1977–1982.
- Dubois M., Gilles K. A., Jamilton J. K., Rebers P. A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. *Anal Chem.* Vol. 28: 350-356.
- Eijsink V. G. H., Skeie M., Middelhoven P. H., Brurberg M. B., Ness I. F. 1998. Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3275-328.
- Elegado F., Guerra M., Macayam R., Mendoza H., Lirazan M. 2004. Spectrum of bacteriocina activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD-PCR. *Int J Food Microbiol.* 95: 11-18.
- Ennahar S., Sashihara T., Snomoto K., Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* 24, 85-106.
- Faye T., Langsrud T., Nes I., Holo H. 2000. Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from *Propionibacterium thoenii*. *Appl Environ Microbiol* 66(10): 4230-4236.
- Fernández E. 2000. Microorganismos de interés sanitario: Bacterias ácido lácticas. En: *Microbiología e inocuidad de los alimentos*. Universidad Autónoma de Querétaro. Pp. 43-48.
-

- Fiorentini A. M., Sant'Anna E. S., Porto A. C. S., Mazo J. Z., Franco D. G. M. 2001. Influence of bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. *Braz J Microbiol* 32, 42–6.
- Fox P. F., Guinee T. P., Cogan T. M., McSweeney P. L. H. 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. Aspen Publisher Inc. Maryland. United States.
- Galanakis C. M. 2012. Recovery of high added-value components from food wastes: Conventional, emerging technologies and commercialized applications. *Trends Food Sci. Technol.* Vol. 26, no. 2, pp. 68–87.
- Galvez A., Abriouel H., Lopez R. L., Omer N. B. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120, 51–70.
- Galvez A., Abriouel H., Omar N. B., Lucas R. 2011. Food Applications and Regulation. In: Drider D, Rebuffat S, eds. *Prokaryotic antimicrobial peptides: from genes to applications*. Germany: Springer Science, 353–90.
- Garrigues C., Loubiere P., Lindley N. D., Cocaigh-Bousquet M. 1997. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *J Bacteriol* 179:5282–5287.
- Garsa A. K., Kumariya R., Sood S. K., Kumar A., Kapila S. 2014. Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 6, 47–58.
- Gasser F. 1994. Safety of lactic acid bacteria and their occurrence in human clinical infections. *Bull Ins. Pasteur*, 92: 45-67.
- Gilliland, S. E. 1986. Bacterial starter cultures for food. S. E. Gilliland (ed.). CRC Press Inc., Boca Raton, Florida.
- Gilliland, S. E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 175-188.
- Gobetti M., De Angelis M., Corsetti A., Di Cagno R. 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends Food Sci. Technol*, 16: 57-69.
-

- González-Martínez B.E., Gómez-Treviño M., Jiménez-Salas Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. *Revista Salud Pública y Nutrición*, 4(2).
- González S. Y., Domínguez J., García B. E., Prado L. A., Regalado C. 2010. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *J Food Sci* 75: M347–M353.
- Guerra N. P., Araujo A. B., Barrera A. M., Agrasar A. T., Macias C. L., Carballo J., Pastrana L. 2005. Antimicrobial Activity of Nisin Adsorbed to Surfaces Commonly Used in the Food Industry. *J Food Prot* 68(5): 1012-1019.
- Guerra N. P., Pastrana L. 2002. Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. *Process Biochemistry*, 37(9): 1005-1015.
- Guerra N. P., Pastrana L. 2003. Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultures. *Biotechnol Appl Biochem* 38:157–167.
- Guerra N. P., Rúa M. L., Pastrana L. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. *Int J Food Microbiol*, 70, 267–81.
- Guerra N. P., Torrado A, López C., Fajardo P., Pastrana L. 2007 Dynamic mathematical models to describe the growth and nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 in both batch and realalized fed-batch cultures. *J Food Eng* 82:103–113.
- Guerrero Rodríguez W. J., Gómez Aldapa C. A., Castro Rosa J., González Ramírez C. A., Santos López E. M. 2009. Lactosuero y su problemática en el medio ambiente en el Valle de Tulancingo. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial 9:321-328. *Revista Salud Pública y Nutrición*, Edición Especial 10:51-56.
- Gui M., Li P. 2013. Production of pentocin 31-1 by high cell density *Lactobacillus pentosus* 31-1 repeated batch cell recycle fermentations. *African Journal of Microbiology Research*, 7(36): 4512-4520.
-

- Han B., Yu Z., Liu B., Yu Z. Ma Q., Zhang R. 2011. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* YJG, isolated from the mucosa of the gut of healthy chickens. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 5(10), 1147–55.
- Hassan A., N., Frank J. F. 2001. Starter cultures and their use. In: *Applied Dairy Microbiology*. Marth E., Steele J. (Ed). 2 ed. New York. Marcel Decker.
- Heng N. C. K., Wescombe P. A, Burton J. P, Jack R. W. and Tagg L. R. 2007. The diversity of bacteriocins in Gram-positive bacteria. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 45-90.
- Hirsch, A. 1951. Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *J. Gen. Microbiol.* 5: 208 –221.
- Holzapfel, W. H y Wood, B. J. B. 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective, En: *The genera of lactic acid bacteria*. Holzapfel, W. H y Wood, B. J. B. (Eds). Chapman and Hall press, Gran Bretaña pp. 1-5.
- INEGI. 2012. Sistema de Cuentas Nacionales de México. Cuentas de bienes y servicios.
- Jay, J. M. (1992). *Microbiología moderna de los alimentos*. (Eds). ACRIBIA, Zaragoza España pp. 441-449.
- Jeevaratnam K., Jamuna M. y Bawa A. S. 2005. Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Biotechnol* 4:446-454.
- Kabuki T., Uenishi H., Watanabe M., Seto Y., Nakajima H. 2007. Characterization of a bacteriocin, thermophilin, 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT 1277. *J Applied Microbiol*, 102: 971-980.
- Kandler O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antoine Van Leeuwenhoek* 49, 2009-229. RADLER F. 1975 The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. Cutting C.V. and Whiting G.C. pp. 17-26, London: Academic Press.
- Kawai Y., Arakawa K., Itoh A., Saitoh B., Is-hii Y., Nishimura J., Kitazawa H., Itoh T. y Saito T. 2003. Heterologous expression of gassericin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus gasseri* LA39. *Anim Sci J*, 74, 45-51.
-

- Kemperman R., Kuipers A., Karsens H., Nauta, A., Kuipers, O. y Kok J. 2003. Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574. *Appl Environ Microbiol*, 69, 1589-1597.
- Khay E., Ouhsassi M., El Harsal A., Idaomar M., Abrini J. 2013. Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. *Curr Res Microbiol Biotechnol* 1(4): 155-159.
- Kim M. H., Kong Y. J., Baek H., Hyun H. H. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus sp.* GO5. *J Biotechnol*, 121(1): 54-61.
- Kirk R. S., Sawyer R.; Egan H. Composición y análisis de alimentos de Pearson, segunda edición; Grupo Editorial Patria SA de CV, México, 2009.
- Klaenhammer T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337–349.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86.
- Kok J, Holo H., van Belkum M., Haandrikman A. J., Nes I. F. 1993. Non-nisin bacteriocins in lactococci : biochemistry, genetics and mode of action. En *Bacteriocin of lactic acid bacteria* (D Hoover, L Steevenson) Academic Press, New York, 121-150.
- Lai A. C., Tran S., Simmonds R. S. 2002. Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *FEMS Microbiology Letters*, 215, 133-138.
- Leal-Sánchez M., Jiménez-Díaz R., Maldonado-Barragán A., Garrido Fernández A., Ruiz-Barba J. 2002. Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(9): 4465-4471.
- Leães F. L., Vanin N. G., Sant'Anna V., Brandelli A. 2011. Use of byproducts of food industry for production of antimicrobial activity by *Bacillus sp.* P11. *Food Bioprocess Technol* 4:822–828.
-

- Leroy F., De Vuyst L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antilisterial bacteriocin sakacin K. *Appl Environ Microbiol*, 65(3): 974-981.
- Leroy F., Vankrunkelsven S., De Greef., De Vuyst L. 2003. The stimulating effect of a harsh environment on the bacteriocin activity by *Enterococcus faecium* RZS C5 and dependency on the environmental stress factor used. *Int. J. Food. Microbiol.* 83: 27–38.
- Lianou A, Sofos J. N. 2007. A review of the incidence and transmission of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat products in retail and food service environments. *J Food Prot* 70(9):2172-2198.
- Lindgren S. E. y Dobrogosz W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 87: 149-164.
- López M. A. 2014. Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en alimentos, mediante el cultivo de bacterias ácido lácticas usando medios de cultivo alternativos. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Agropecuarias, UAEH. 80 páginas.
- Lyhs U. 2002. Lactic acid bacteria associated with the spoilage of fish products. Department of Food and Environmental Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki pp. 9-10.
- Macías M. E. y Torres M. R. 2014. Saneamiento y detección de microorganismos. En: Guerrero I., García B. E., Wachter M. C., Regalado C (comp.). *Microbiología de los alimentos*. México: Limusa, p.p. 631.
- Madigan M. T., Martinko J. M., Dunlap P. V., Clark D. P. 2009. *Brock Biología de los microorganismos*, Duodécima edición, México Pearson Addison Wesley.
- Makkar R. S., Cameotra S. S., Banat I. M. 2011. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, 1, 5–23.
- Maldonado, C. (2016). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. Tesis de licenciatura. Fac. Química. UNAM. 111 páginas.
-

- Maldonado R. y Llanca L. 2007. Efecto de la incorporación de nisina sobre la supervivencia de *Staphylococcus aureus* en queso de mano, Rev. Fac. Agron., 33,147- 163. 2007.
- Martinez J. M., Kok J., Sanderrrs J. W., Hernandez P. E. 2000. Heterologous Coproduction of Enterocin A and Pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*: Detection by Specific Peptide-Directed Antibodies. Appl. Environ. Microbiol; 66 (8): 3543-3549.
- Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E. H., Skandamis P. N., Galiotou-Panayotou M., Papanikolaou S. 2011. Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. New Biotechnol, 28, 600–9.
- McAuliffe O., Ross R. P. and Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol Rev 25, 285-308.
- Mckay L. L., Baldwin K. A., Efstathiou J. D. 1976. Transductional evidence for plasmid linkage of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. Appl. Environ. Microbiol. 32: 45-52.
- Mckay L. L., Baldwin K. A. 1978. Stabilization of lactose metabolism in *Streptococcus lactis* C2. Appl. Environ. Microbiol. 36: 360-367.
- Miller G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Moll G. N., Akker E. V. D., Hauge H. H., Nissen-Meyer J., Nes I. F., Konings W. N. and Driessen A. J. 1999. Complementary and overlapping selectivity of the two-peptide bacteriocins plantaricin EF and JK. J. Bacteriol. 181 (16): 4848-4852.
- Moll G. N., Konings W. N. and Driessen A. J. M. 1999. Bacteriocins: mechanism of insertion and pore formation. Antonie Van Leeuwenhoek 76, 185-198.
- Monroy M., Castro T., Fernández F. J., Mayorga L. 2009. Revisión Bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. ContactoS, 73: 63-72.
- Montville T. J. and Chen Y. 1998. Mechanistic action of pediocin and nisina: recent progress and unresolved questions. Appl Microbiol Biotechnol 50: 511-519.
-

- Murthy P. S., Madhava Naidu M. 2012. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition-A review. *Resources, Conservation and Recycling*, 66, 45-58.
- Mussatto S. I., Machado E. M. S., Martins S., y Teixeira J. 2011b. Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food Bioproc Tech* , 4, 661–672.
- Nes I. F., Diep D. B., Havarstein L. S., Brurberg M. B., Eijsink V., Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*, 70: 113-128.
- Nilsson L., Nielsen M., Ng Y., Gram L. 2002. Role of acetate in production of an autoinducible Class IIa bacteriocin in *Carnobacterium piscicola* A9b. *Appl Environ Microbiol*. 68(5): 2251 – 2260.
- Núñez M., Tomillo J., Gaya P., and Medina M. 1996. Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison at arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft* 51, 7-10.
- Nychas G. J. E. 1995. Natural Antimicrobials from plants. En: *New Methods of food preservation*. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21.
- O' Keefe T., Hill C. 2000. Bacteriocins. En: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Editores: Robinson, R.K., Batt, C.A. y Patel, P.D.. Academic Press. Londres, Gran Bretaña. 183-189.
- Olvera, M. E. (2010). Efecto del medio de cultivo en la producción de compuestos antibacterianos por *Enterococcus sp.* Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 80 páginas.
- Oscáriz J. C., Pisabarro A. G. 2001. Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Int. Microbiol* 4, 13-19.
- Osorio A. 3 de Julio 2013. Derrame de melaza en presa de Jalisco provoca la muerte de miles de peces. *Proceso*. [En línea]. Disponible en <http://www.proceso.com.mx/346506/derrame-de-melaza-en-presa-de-jalisco-provoca-la-muerte-de-miles-de-peces> (ultimo acceso 05 de agosto de 2017).
-

- Palavecino E. 1997. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana. Boletín de la escuela de medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Vol. 26 No. 3.
- Parente E., Ricciardi A. and Addario G. 1994. Influence of pH on growth and bacteria production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 140 NWC during batch fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 41, 388-394.
- Parinaz T., Nasrin S., Mohammad R. E., Mohammad R. K., Hossein J. 2012. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. Braz J Microbiol, 1452-1462.
- Piard J. C. y Desmazeaud M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait, 71: 525-541.
- Piard J. C. y Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait, 72: 113-142.
- Piña M. D., Uribe C., Regalado C., Castaño E., García B. E., Amaya S. L. 2011. Producción de nisina por *lactococcus lactis* UQ2 usando suero lácteo suplementado y evaluación de su actividad después del secado por aspersión. Ciencia@UAQ, 4(2): 47-55.
- Pirt S. J. 1985. Principles of microbe and cell cultivation. Blackwell Scientific Publicationss, Oxford, United Kingdom.
- Povolo S., Toffano P., Basaglia M., Casella S. 2010. Polyhydroxyalkanoates production by engineered *Cupravidus necator* from waste material containing lactose. Bioresour Technol 101:7902–7907.
- Prazeres A. R., Carvalho F., Rivas J. 2012. Cheese whey management: a review. J Environ Manage 110:48–68.
- Pucci M. J., Vedamuthu E. R., Kunka B. S. y Vandenberg P. A. 1988. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1•0. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2349-2353.
-

- Quesada A. 2013. Principios de biotecnología microbiana. San José, CR: Edit. UCR.
- Ramírez M. S. 2005. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, UAEH. 77 páginas.
- Renye J. A., Somkuti G. A., Garabal J. I., Steinberg D. H. 2016. Bacteriocin production by *Streptococcus thermophilis* in complex growth media. *Biotechnol Lett* 38: 1947-1954.
- Robertson A., Tirado C., Lobstein T., Jermini M., Knai C., Jensen J., Ferro-Luzzi A., James W. P. T. 2004. Food and health in Europe: a new basis for action. Geneva: WHO Regional Publications, European Series, 96.
- Rodríguez, C. 2011. Estudio sobre interacciones negativas de bacterias lácticas del pozol. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 142 páginas.
- Ruiz-Barba J. L., Cathcart D. P., Warner P. J., Jiménez-Díaz R. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPCO10, a bacteriocin producer, as starter culture in spanish-style green olive fermentations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60: 2059-2064.
- Saeed A. H., Salam A. I. 2013. Current limitations and challenges with lactic acid bacteria: a review. *Food Nutr Sci*, 4, 73–87.
- Salminen S. 1993. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker.
- Sánchez, O. I. 2003. Uso del permeado de suero suplementando en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis de maestría. Universidad Autónoma del Estado de Querétaro pp. 5-15.
- Santillán M. A. 2004. Aislamiento y caracterización de cepas bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo pp. 1-11.
- Skaugen M., Nissen-Meyer J., Jung G., Stevanovic S., Sletten K., Abildgaard C. I. M. y Nes I. F. 1994. *In vivo* conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *J. Biol. Chem.*, 269: 27183-27185.
- Sobti R.C. y Pachouri S. S. 2009. Essentials of biotechnology. New Delhi: Ane Books.
-

- Sousa M. N. B., Mendes E. N., Apolonio A. C. M., Farias L. D. M., Magalha E. S. 2010. Bacteriocin production by *Shigella sonnei* isolated from faeces of children with acute diarrhea. *APMIS*. 118: 125–135.
- Stainer R. Y. et al. 1987 *General Microbiology* fifth edition. Pp. 496-500 London: Macmillan education.
- Stainer R., 1996. *Microbiología*, segunda edición, editorial Reverte, p.p. 195-209.
- Stanbury P. and Whitaker A. 1995. *Principles of fermentation technology*, Oxford, Pergamon Press.
- Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*, 70: 331-345.
- Stiles M. E. y Holzapfel W. H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int J Food Microbiol*. 36:1-29.
- Stoyanova L. G., Ustyugova E. A., Netrusov A. I. 2012. Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Appl Biochem and Microbiol* 48: 229-243.
- Taheri P., Samadi N., Reza M., Jamalifar H. 2012. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ST1 isolated from goat milk. *Braz J Microbiol*, 43(4): 1452-1462.
- Tavera, F. (2010). Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 105 páginas.
- Ten Brink B., Minekus M., van der Vossen J. M. B. M., Leer R. J., Huis in't Veld, J. H. L. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. *J. Appl. Acteriol*; 77: 140-148.
- Tetrapak. Suero: Agregar valor a los alimentos. [En línea]. Disponible en <http://www.tetrapak.com/mx/findbyfood/whey-powder> (ultimo acceso 05 de agosto de 2017).
-

- Thomas L. V., Clarkson M. R., Delves-Broughton J. 2000. Nisin. In: Naidu AS, eds. Natural food antimicrobial systems. Boca Raton, FL: CRC Press, 463–524.
- Triana O., Leonard M., Saavedra F., Fernández N., Gálvez G., Peña E. 1990. El bagazo de la caña de azúcar. Atlas del Bagazo de la Caña de Azúcar. Cuba-9, GEPLACEA, PNUD, ICIDCA. pp. 39 - 44.
- Todorov S. D. 2008. Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of the adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. Braz J Microbiol, 39, 178–87.
- Todorov S. D., van Reenen C. A., Dicks L. M. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. J. Gen. Appl. Microbiol. 50, 149–157.
- Todorov S. D., Dicks, L. M. T. 2005. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LDBR, isolated from spoiled black olives. J. Microbiol. 43, 370–374.
- Todorov, S. D., Dicks, L. M. T. 2005. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from Boza. Food Technol. Biotechnol. 43 (2) 165-173.
- Todorov S. D., Oliveira R. P. S., Vaz-Velho M. 2012. Media optimization of bacteriocin ST22CH production by *Lactobacillus sakei* ST22CH isolated from salpicao, a traditional meat-product from Portugal. Chen Eng Trans 27:283-288.
- Todorov S. D., Vaz-Velho M., de Melo Franco B. D. G, Holzapfel W. H. 2013. Partial characterization of bacteriocins produced by three strains of *Lactobacillus sakei*, isolated from salpicao, a fermented meat product from North-West of Portugal, Food Control 30:111-121.
- Toit M. D., Franz C. M. A. P., Dicks L. M. T., Holzapfel W. H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J. Appl. Microbiol; 88:483-494.
- Valderrama, A. 2012. Diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa Tabasco. Tesis de Licenciatura. Fac. Química. UNAM. 117 páginas.
-

- Valencia D. E. y Ramírez C. M. L. 2009. La industria de la leche y la contaminación del agua. Elementos: Ciencia y cultura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Vol. 16, Núm. 73.
- Vera Pingitore E., Hebert E. M., Sesma F., Nader-Macias M. E. 2009. Influence of vitamins and osmolites on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* CRL 1328 in a chemically defined medium. Can J Microbiol, 55, 304–10.
- Vignolo G., Palacios J., Farías M. E., Sesma F., Schillinger U., Holzapfel W., Oliver G. 2000. Combined Effect of Bacteriocins on the Survival of Various Listeria Species in Broth and Meat System. Current Microbiol. 41: 410-416.
- Wacher M. C. 2014. Importancia e incidencia de los microorganismos en los alimentos. En: Guerrero I., García B. E., Wacher M. C., Regalado C (comp.). Microbiología de los alimentos. México: Limusa, p.p. 30.
- Wang K. L., Hung Y. T., Howard H. L. 2008. Tratamiento de los residuos de la industria del procesamiento de alimentos. España, Acribia.
- Wescombe, P. A., Tagg, J. R. 2003. Purification and characterization of streptin, a type A1 lantibiotic produced by *Streptococcus pyogenes*. Appl, Environ. Microbiol. 69, 2737-2747.
- Wu C. W., Yin L. J. y Jiang S. T. 2004. Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. J. Agric. Food Chem. 52:1146-1151.
- Yang R., Ray B. 1994. Prevalence of bacteriocin producing psychrotrophic *Leuconostoc* associated with spoilage of vacuum -packaged processed meats and their biological control. J. Food Prot., 57: 209-217.
- Zalán Z., Németh E., Baráth A., Halász, A. 2005. Influence of growth medium in hydrogen peroxide and bacteriocin production of *Lactobacillus* strains, Food. Technol. Biotechnol., 43,219-225.
- Zhou L., van Heel A. J., and Kuipers O. P. 2015. The length of a lantibiotic hinge region has profound influence on antimicrobial activity and host specificity. Front. Microbiol. 6:11.
- Zhu W. M., Liu W., Wu D. Q. 2000. Isolation and characterization of a new bacteriocin from *Lactobacillus gasseri* KT7. J. Appl. Microbiol; 88: 877-886.
-

Zunabovic M., Domig K. J., Kneifel W. 2011. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments – A review. LWT Food Sci Technol 44:351-362.