



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE COMPUESTOS SIMILARES A  
BACTERIOCINAS DE UNA CEPA DE STREPTOCOCCUS SP. AISLADA DE  
ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES.**

**T E S I S**

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

**P R E S E N T A:**

**LARA GONZÁLEZ ELIZABETH BERENICE**



**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2018.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



---

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Gloria Díaz Ruíz  
**VOCAL:** Aleida Mina Cetina  
**SECRETARIO:** Carmina Montiel Pacheco  
**1er. SUPLENTE:** Elsi Ideli Juárez Arroyo  
**2° SUPLENTE:** María del Carmen Wachter Rodarte

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 324, DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS Y  
BIOTECNOLOGÍA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA**

**ASESOR DEL TEMA:** \_\_\_\_\_  
Dra. Gloria Díaz Ruíz

**SUPERVISOR TÉCNICO:** \_\_\_\_\_  
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

**SUSTENTANTE:** \_\_\_\_\_  
Elizabeth Berenice Lara González



## 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 Universidad Nacional Autónoma de México, que me dio la más grande oportunidad de realizar mis metas y junto con los profesores que forman parte de ella que abrieron las puertas del conocimiento para mí. A la Facultad de Química que fue el origen de esta nueva persona en la que me convertí y mi segundo hogar.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz, por brindarme la oportunidad de trabajar con ella y desarrollar el tema para la tesis de licenciatura desde la Estancia Estudiantil. Por su paciencia y tolerancia debido a todas las adversidades que se presentaron a lo largo de este camino y ayudarme a conseguir este gran logro profesional.

A la Dra. Carmen Wachter por pertenecer a su grupo de investigación en el laboratorio 324 de la Facultad de Química, por sus consejos, observaciones y revisión de la tesis.

A la profesora Sandra Pérez Munguía por su gran apoyo y conocimiento para llevar a cabo la técnica de electroforesis de gel SDS-PAGE y zimogramas.

Gracias a las profesoras Carmina Montiel y Aleida Cetina, por el tiempo para revisar y realizar las observaciones para mejorar este escrito y ser parte del jurado para culminar esta etapa.

A mis compañeros del laboratorio 324, Salvador, Carolina, Karla, Fernando y a Tere por su gran ayuda durante los largos días de trabajo para que estos fueran momentos inolvidables llenos de aprendizaje.



## ÍNDICE

ÍNDICE .....	6
ÍNDICE DE TABLAS.....	8
ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
RESUMEN.....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
ANTECEDENTES.....	16
<b>CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS.</b> .....	16
<b>FERMENTACIONES.</b> .....	19
<b>BACTERIAS LÁCTICAS.</b> .....	23
<b>INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO.</b> .....	25
<i>Temperatura.</i> .....	25
<i>pH.</i> .....	26
<b>PROTEÍNAS Y PÉPTIDOS CON ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA PRODUCIDAS POR BACTERIAS</b>	
<b>ÁCIDO LÁCTICAS.</b> .....	26
<i>Bacteriocinas.</i> .....	26
<i>Peptidoglucano hidrolasas.</i> .....	31
<b>PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS.</b> .....	33
JUSTIFICACIÓN .....	36
HIPÓTESIS .....	38
OBJETIVOS.....	38
<b>OBJETIVO GENERAL:</b> .....	38
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	38
METODOLOGÍA.....	39
<b>DIAGRAMA GENERAL</b> .....	39
<b>CEPAS UTILIZADAS.</b> .....	40
<b>ACTIVACIÓN DE CEPAS.</b> .....	40
<b>CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.</b> .....	40
<b>DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA CEPA <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN</b>	
<b>DIFERENTES CONDICIONES DE TEMPERATURA Y DE PH INICIAL EN EL MEDIO MRS</b> .....	41
<i>Reactivación de cepas.</i> .....	41
<i>Condiciones para el crecimiento y la producción de sustancias</i>	
<i>antimicrobianas por <i>S. lutetiensis</i> A45212.</i> .....	41
<i>Evaluación del crecimiento de cepas en medio MRS.</i> .....	42
<i>Detección de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en</i>	
<i>agar.</i> .....	43
<b>CONCENTRACIÓN Y PURIFICACIÓN PARCIAL DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS</b>	
<b>PRODUCIDAS POR <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212.</b> .....	44
<i>Precipitación con sulfato de amonio y diálisis</i> .....	44
<b>PERFIL DE PROTEÍNAS Y ZIMÓGRAMAS.</b> .....	45
<i>Determinación del peso molecular del compuesto antimicrobiano.</i> .....	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	47
<b>REACTIVACIÓN Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 Y</b>	
<b>MICROORGANISMOS PATÓGENOS INDICADORES.</b> .....	47



<b>EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.</b> .....	48
<b>EVALUACIÓN DEL EFECTO DE PH INICIAL DEL MEDIO DE FERMENTACIÓN PARA LA PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS.</b> .....	53
<b>EVALUACIÓN DE CRECIMIENTO EN LAS MEJORES CONDICIONES (TEMPERATURA Y PH INICIAL DEL MEDIO DE CULTIVO) DE <i>STREPTOCOCCUS LUTETIENSIS</i> A45212 EN EL MEDIO MRS...</b> .....	57
<b>PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIÁLISIS DE PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.</b> .....	60
<b>PERFIL PROTEICO Y ZIMOGRAMA</b> .....	62
<b>CONCLUSIONES</b> .....	67
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	68
<b>ANEXOS</b> .....	69
<b>ANEXO 1.</b> .....	69
<b>ANEXO 2.</b> .....	70
<b>ANEXO 3.</b> .....	71
<b>ANEXO 4.</b> .....	72
<b>ANEXO 5.</b> .....	72
<b>BIBLIOGRAFÍA.</b> .....	77



## ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1. LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN DE ALIMENTOS A TRAVÉS DE LA HISTORIA.....	16
TABLA 2. CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE CONSERVACIÓN.....	18
TABLA 3. CLASIFICACIÓN DE BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS.....	28
TABLA 4. DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS UTILIZADAS.....	40
TABLA 5. CONDICIONES DE PH INICIAL EN EL MEDIO DE FERMENTACIÓN Y TEMPERATURA DE INCUBACIÓN DURANTE EL CRECIMIENTO DE LA <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212. ....	42
TABLA 6. COMPOSICIÓN DE MEDIO BHI TAMPONADO (BHI-T) POR LITRO. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR (TAVERA, 2010).....	44
TABLA 7. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 CONTRA <i>L. MONOCYTOGENES</i> DURANTE SU CRECIMIENTO A 30 Y 37 °C.....	50
TABLA 8. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL EN SOBRENADANTES DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 DURANTE SU CRECIMIENTO A 30 Y 37 °C.....	50
TABLA 9. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SOBRENADANTES DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 CONTRA <i>L. MONOCYTOGENES</i> EN MEDIO BHI TAMPONADO. ....	55
TABLA 10. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE SOBRENADANTES DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 A DIFERENTES VALORES DE PH INICIALES DE FERMENTACIÓN. ....	55
TABLA 11. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE SOBRENADANTES DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN CONDICIONES ÓPTIMAS (37 °C Y PH INICIAL DE 7.5) CONTRA <i>L. MONOCYTOGENES</i> (PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR).....	58
TABLA 12. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL DE SOBRENADANTES DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 A 37 °C Y PH INICIAL DE 7.5.....	58
TABLA 13. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA CONTRA <i>L. MONOCYTOGENES</i> DE SOBRENADANTES TRATADOS CON SULFATO DE AMONIO DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 (MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR). ....	60
TABLA 14: COMPOSICIÓN DE BUFFER 2X:.....	69
TABLA 15. FORMULACIÓN DE GEL CONCENTRADOR (4% T, 2.6% C). (PARA DOS GELES). ....	70
TABLA 16: FORMULACIÓN DEL GEL SEPARADOR (16.5% T, 2.6% C). (PARA DOS GELES). ....	70
TABLA 17: FORMULACIÓN DEL GEL SEPARADOR PARA EL ZIMOGRAMA CON <i>MICROCOCCUS</i> <i>LYSODEIKTICUS</i> (16.5% T, 2.6% C). (PARA DOS GELES). ....	71
TABLA 18: FORMULACIÓN DEL GEL SEPARADOR PARA EL ZIMOGRAMA CON <i>LISTERIA</i> <i>INNOCUA</i> 2 (16.5% T, 2.6% C). (PARA DOS GELES). ....	71
TABLA 19: COMPOSICIÓN DE SOLUCIÓN DESTEÑIDORA 1.....	72
TABLA 20: COMPOSICIÓN DE SOLUCIÓN DESTEÑIDORA 2.....	72

## ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1. ESTRUCTURA DE DIVERSAS BACTERIOCINAS DE BACTERIAS GRAM POSITIVAS. ESTRUCTURA GLOBULAR DE LOS LANTIBIÓTICOS NISINA (A) Y MERSACIDINA (B). LOS RESIDUOS DE LANTIONINA SE INDICAN EN NEGRO Y COMO ALA—S—ALA. LOS RESIDUOS DE β-METIL-LANTIONINA SE MUESTRAN EN NEGRO Y COMO ABU—S—ALA 8, 9. C) ESTRUCTURA A-HELICOIDAL DE LA ENTEROCINA AS-48 DE 70 RESIDUOS. SE MUESTRA SU ESTRUCTURA CÍCLICA, CON LOS EXTREMOS AMINO Y CARBOXILO UNIDOS POR UN ENLACE PEPTÍDICO 11.....	29
FIGURA 2. MODELO DE FORMACIÓN DE POROS POR NISINA (MOLL, 1996).....	30
FIGURA 3. ESTRUCTURA DEL PEPTIDOGUCANO Y ESPECIFICIDAD POR SUSTRATO DE LAS PGHS (ADAPTADO DE LAYEC ET AL., 2008).....	32
FIGURA 4. COLONIAS DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN AGAR MRS. ....	47
FIGURA 5. VISTA AL MICROSCOPIO DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212. ....	47
FIGURA 6. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE EL CRECIMIENTO (D.O) DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN EL MEDIO MRS A PH 6.5. ....	48
FIGURA 7. EFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA CUENTA VIABLE DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN MEDIO MRS A PH 6.5. ....	49
FIGURA 8. VALORES DE PH DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 A 30 °C Y 37 °C EN MEDIO MRS. ....	49
FIGURA 9. EFECTO DE PH INICIAL SOBRE LA DENSIDAD ÓPTICA DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN MEDIO MRS A 30 °C. ....	53
FIGURA 10. EFECTO DEL PH INICIAL SOBRE LA CUENTA VIABLE DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN MEDIO MRS A 30 °C. ....	54
FIGURA 11. VALORES DE PH DURANTE EL CRECIMIENTO DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN MEDIO MRS A 30 °C.....	54
FIGURA 12. DENSIDAD ÓPTICA A 600 NM DURANTE LA FERMENTACIÓN EN LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO (37 °C CON PH INICIAL DE 7.5) DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN MEDIO MRS. ....	57
FIGURA 13. CUENTA EN PLACA DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 EN MEDIO MRS DURANTE LA FERMENTACIÓN A 37 °C Y PH INICIAL 7.5 PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	57
FIGURA 14. VALORES DE PH DURANTE LA FERMENTACIÓN EN LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO (37 °C Y PH INICIAL DE 7.5) DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212 PARA LA PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN EL MEDIO MRS. ....	58
FIGURA 15. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR. EJEMPLO DE INHIBICIÓN DE <i>L. MONOCYTOGENES</i> POR SOBRENADANTE SIN TRATAR DE <i>S. LUTETIENSIS</i> A45212, MEDIO BHI TAMPONADO.....	59
FIGURA 16. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN FRACCIONES OBTENIDAS POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO. ....	61
FIGURA 17. CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN FRACCIONES OBTENIDAS DIALIZADAS DESPUÉS DE PRECIPITAR CON SULFATO DE AMONIO. ....	61
FIGURA 18. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA (16.5% T, 2.6% C) EN (A) <i>MICROCOCCUS</i> <i>LYSODEIKTICUS</i> Y EN (B) <i>LISTERIA</i> <i>INNOCUA</i> . MUESTRAS BAJO CONDICIONES REDUCTORAS A 85 °C, 10 MIN (CR, TT) Y NO REDUCTORAS SIN TRATAMIENTO TÉRMICO (NR, SIN TT) CORRESPONDIENTES A LA FRACCIÓN PRECIPITADA AL 60 % DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (60); FRACCIÓN PRECIPITADA AL 70 % DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (70); FRACCIÓN PRECIPITADA AL 80% DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (80); ESTÁNDARES PRETEÑIDOS (EST) (#SM0671, FERMENTAS). APROXIMADAMENTE 30 μL MUESTRA/POZO. INCUBACIÓN EN BUFFER TRIS-HCL (PH 7.0), 24 H A 30 °C. GEL DOC™ XR+ IMAGING SYSTEM (BIO-RAD). ....	63
FIGURA 19. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD PGH (16.5% T, 2.6% C) EN (A) <i>MICROCOCCUS</i> <i>LYSODEIKTICUS</i> Y EN (B) <i>LISTERIA</i> <i>INNOCUA</i> . MUESTRAS -SIN TRATAMIENTO TÉRMICO-	



CORRESPONDIENTES A LA FRACCIÓN PRECIPITADA AL 60 % DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (60); FRACCIÓN PRECIPITADA AL 70 % DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (70); FRACCIÓN PRECIPITADA AL 80% DE SATURACIÓN CON SULFATO DE AMONIO Y DIALIZADA (80). ESTÁNDARES PRETEÑIDOS DE BAJO PESO MOLECULAR (EST) (BIO-RAD) Y ESTÁNDARES PRETEÑIDOS (ST) (FERMENTAS). APROXIMADAMENTE 30  $\mu$ L MUESTRA/POZO. INCUBACIÓN EN BUFFER TRIS-HCL (PH 7.0), 96 H A 30 °C. GEL DOC™ XR+ IMAGING SYSTEM (BIO-RAD). ..... 63

FIGURA 20. PERFIL ELECTROFORÉTICO (16.5% T, 2.6% C). MUESTRAS BAJO CONDICIONES REDUCTORAS A 85 °C, 10 MIN (CR, TT) Y NO REDUCTORAS SIN TRATAMIENTO TÉRMICO (NR, SIN TT) COMO EN LA FIGURA 18A. .... 64

FIGURA 21. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 30 °C A PH INICIAL 6.5. BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. .... 73

FIGURA 22. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 37 °C A PH INICIAL 6.5. BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. .... 73

FIGURA 23. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 30 °C A PH INICIAL 7.5. BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. .... 74

FIGURA 24. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 30 °C A PH INICIAL 5.5 BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. .... 74

FIGURA 25. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 30 °C A PH INICIAL 8.0. BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*. .... 75

FIGURA 26. HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR, PRODUCIDOS POR SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 A 37 °C A PH INICIAL 7.5 (CONDICIONES ÓPTIMAS). BACTERIA INDICADORA: *LISTERIA MONOCYTOGENES*.75

FIGURA 27. PRUEBA DE INHIBICIÓN CON LA TÉCNICA DE DIFUSIÓN EN AGAR POR LOS SOBRENADANTES DE CULTIVO DE LA FERMENTACIÓN DE *S. LUTETIENSIS* A45212 (37 °C CON PH INICIAL 7.5 DE MEDIO MRS) FRENTE A *LISTERIA INNOCUA* 2 COMO MICROORGANISMO INDICADOR. .... 76



## RESUMEN

Dado que la población está interesada en consumir alimentos inocuos con la menor cantidad de aditivos químicos y que sean sensorialmente adecuados y con valor nutritivo elevado; la investigación de nuevos bioconservadores de origen bacteriano para la preservación de alimentos está en auge en diferentes grupos de investigación, cuyos trabajos se dirigen al estudio de la diversidad de microorganismos que los sintetizan, las etapas de su síntesis durante el crecimiento de la bacteria productora, las metodologías de actividad antimicrobiana, así como la producción, el aislamiento, purificación y descripción de las características biológicas, bioquímicas y genéticas (De la Fuente-Barboza, 2009).

Las bacterias ácido lácticas se han empleado históricamente en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, como agentes de bioconservación. Tal función se atribuye a la producción de compuestos antibacterianos, como pueden ser los ácidos orgánicos o incluso compuestos de naturaleza proteínica, como las bacteriocinas y las enzimas que degradan la pared celular de bacterias (p. ej., peptidoglucano hidrolasas). La adición de compuestos antimicrobianos producidos por bacterias, en los alimentos podría representar una excelente estrategia para el control de bacterias patógenas perjudiciales para la salud humana como son *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* y *Bacillus cereus*, entre otras.

Se seleccionó la cepa *Streptococcus lutetiensis* A45212 aislada del pozol, productora de una proteína con acción antimicrobiana (Maldonado, 2016), a la cual se le determinaron las mejores condiciones de pH y de temperatura para la mejor producción de la proteína y una óptima actividad antimicrobiana. Para determinar el efecto del pH inicial sobre la producción de la proteína con actividad antimicrobiana, el caldo MRS se



ajustó a pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0; también se evaluó el crecimiento de la cepa a 30 y 37 °C en el mismo medio de cultivo, en todos los casos se inoculó al 1% con *Streptococcus lutetiensis*. Las mejores condiciones de pH y temperatura se determinaron ensayando la actividad antimicrobiana sobre *L. monocytogenes*, de cada condición, mediante el método de difusión en agar. La concentración y purificación parcial de la proteína con actividad antimicrobiana se realizó por precipitación con sulfato de amonio. Se estimó el tamaño de la proteína con actividad antimicrobiana mediante la técnica de electroforesis y el uso de un zimograma. Mediante ensayos de cinéticas de crecimiento se determinó que la mejor condiciones de crecimiento de bacteria y producción de proteína con acción antimicrobiana fue a temperatura de 37 °C en medio MRS con un valor de pH inicial de 7.5, para el aislamiento de la proteína del medio de cultivo el porcentaje de saturación con mayor concentración de proteína fue de 60 % de sulfato de amonio para su posterior estudio en gel SDS-PAGE y en zimograma; donde se observaron don bandas de actividad lítica con un peso molecular de 41 y 33 kDa aproximadamente.



## Introducción

La bioconservación puede ser definida como la extensión de la vida de anaquel y seguridad de un alimento a través del uso de microbiota natural o controlada y/o sus compuestos antimicrobianos (Stiles, 1996).

En la bioconservación de alimentos se incluyen desde técnicas utilizadas para obtener alimentos más seguros hasta la generación de alimentos mínimamente procesados y sin aditivos. Por lo anterior, la bioconservación ha tomado un gran auge basándose en el efecto de los llamados bioconservadores que aumentan la vida útil e incrementan la seguridad de los alimentos ([www.madrimasd.org/biotecnologia](http://www.madrimasd.org/biotecnologia)). La implementación de tecnologías modernas en el procesamiento y aseguramiento de la seguridad microbiológica de los alimentos han disminuido pero no eliminado los riesgos de las enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos contaminados con microorganismos.

La Secretaría de Salud en México ha reportado que bacterias, protozoarios y virus son transmitidos por alimentos y son responsables de enfermedades como el cólera, fiebre tifoidea, shigelosis, brucelosis, salmonelosis, amebiasis, giardiasis, cisticercosis, teniasis, hepatitis viral A, entre otras. Sin embargo, el mayor porcentaje de casos detectados correspondió a la amebiasis intestinal con un 22 %, aunque lamentablemente el mayor porcentaje (71 %) se lo adjudicaron infecciones intestinales cuyo agente etiológico no fue identificado (Flores Luna y Vélez-Méndez, 2002). De manera particular, en el estado de Guanajuato, México, la Secretaría de Salud reportó durante los años 2003 y 2004 un total de 8 939 casos de paratifoidea y otras salmonelosis, los cuales probablemente pudieron tener como fuente de contaminación directa a los alimentos ([www.guanajuato.gob.mx](http://www.guanajuato.gob.mx)). Una aproximación en la investigación para mejorar la seguridad en los alimentos se enfoca en



la búsqueda de nuevos conservadores químicos o en la aplicación de tratamientos físicos más drásticos (altas temperaturas); sin embargo, este tipo de soluciones muestran muchas desventajas como la toxicidad de los conservadores químicos comunes (nitritos), la alteración de las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos, y especialmente contra las nuevas tendencias de compra y consumo de los clientes que demandan alimentos más seguros pero a la vez mínimamente procesados y sin aditivos.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se utilizan para conservar alimentos, incluyendo productos lácteos, verduras, carnes y cereales; las BAL producen sustancias antimicrobianas, como ácidos orgánicos, diacetilo, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y enzimas (peptidoglucano hidrolasas).

Dentro de la diversidad del asombroso metabolismo microbiano, existen bacterias capaces de sintetizar péptidos a nivel ribosómico que pueden sufrir modificaciones postraduccionales y tienen efecto antagónico contra microorganismos con o sin relación filogenética. En los últimos diez años las bacteriocinas se han mantenido dentro del grupo de moléculas biológicas que captaron gran interés de los grupos de investigadores, cuyos trabajos se han dirigido principalmente a cualquiera de las siguientes áreas:

- a) Estudio de la diversidad de microorganismos que las sintetizan,
- b) Conocimiento de las etapas de su síntesis durante el crecimiento de la bacteria productora,
- c) Metodologías para su aislamiento, purificación y producción,
- d) Características biológicas, bioquímicas y genética.

Para conciliar las demandas de los consumidores con los estándares de seguridad necesarios, se ha empezado a sustituir los métodos tradicionales para controlar la descomposición y los microorganismos patógenos en los alimentos a partir de las combinaciones de tecnologías



innovadoras que incluyen sistemas biológicos antimicrobianos como las bacterias ácido lácticas (BAL) y/o sus bacteriocinas. El uso de BAL o sus bacteriocinas ya sea aisladas o en combinación con tratamientos fisicoquímicos suaves o bien, con bajas concentraciones de conservadores químicos naturales o tradicionales, representan una alternativa eficiente para alargar la vida de anaquel y al mismo tiempo incrementar la seguridad de los alimentos a través de la inhibición de bacterias saprófitas y patógenas presentes, pero sin alterar las cualidades nutricionales y sensoriales tanto de materias primas como de los productos alimenticios (Fuente *et al.*, 2010).

En un estudio previo (Maldonado, 2016) investigó un grupo selecto de bacterias ácido lácticas provenientes del pozol y del atole agrio, con actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*, reportó que tres cepas fueron las que tuvieron capacidad inhibitoria frente al dicho microorganismo, probablemente debido a compuestos de tipo bacteriocina, ya que es de origen proteico y termoestable.

En este trabajo se seleccionó a una de esas tres cepas, *S. lutetiensis* A45212, se determinaron las mejores condiciones de crecimiento (temperatura y pH inicial del medio de crecimiento) y con mayor actividad antimicrobiana, para el aislamiento de la proteína del medio de crecimiento se empleó una precipitación selectiva con sulfato de amonio, se concentraron fracciones de proteína, mismas que se separaron usando SDS-PAGE y mediante un zimograma se determinaron las bandas de proteína con actividad antimicrobiana.



## Antecedentes

### Conservación de alimentos.

El alimento es una de las mayores necesidades de todos los seres vivos, en especial del ser humano; por lo que junto con sus derivados, composición y conservación son esenciales para realizar las funciones vitales. El hombre a través de su desarrollo, buscó tener accesibilidad de los productos, mantenerlos frescos y en óptima calidad, lo cual condujo a la necesidad de conservar los alimentos para su consumo (Aguilar, 2012). Desde hace mucho tiempo han existido diferentes métodos de conservación, los cuales se han consolidado y se han perfeccionado; entre los métodos de conservación de alimentos más comunes se encuentran: el salado, el curado, el ahumado, el escabeche, la refrigeración y el calor. En la tabla 1, se muestra un recorrido por la historia, resaltando las épocas más importantes donde se originaron los diferentes métodos de conservación de alimentos o la base para el desarrollo de éstos, que actualmente se siguen aplicando, y en la mayoría de los casos, se van especializando.

Tabla 1. Los métodos de conservación de alimentos a través de la historia.

Época	Método utilizado
Tiempos primitivos	Utilización de sal común, hielo y aire.
Egipto	En esta región se utilizaban una serie de líquidos como el aceite, los derivados del vinagre, y en algunos lugares también se usaba la miel.
Reino Persa	Adición de azúcares
Grecia	Grajeado de frutas y hortalizas.
Antigua Roma	Adición de dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> ) al vino
Anterior al siglo XV	Empleo de adobo (conservación con especias y grasas).
Siglo XVIII	Empleo de bórax.
Siglo XIX	Aplicación de sulfitos a carnes. Pasteurización. En esta etapa, ocurrieron una serie de descubrimientos como el papel de los



	<p>ácidos orgánicos: bórico, fórmico, salicílico, benzoico</p>
Siglo XX	<p>Congelación de alimentos.            En esta etapa, se originaron una gran cantidad de nuevas tecnologías, incluyendo innovadores conservadores químicos.            Irradiación.            Liofilización            Envasado aséptico.            Procesos no térmicos: alta presión, pulsos eléctricos, etc.</p>

(Bello, 2000).

La conservación de productos de origen animal o vegetal ha sido objeto de innovaciones y de una constante actualización de las medidas tradicionales, por diversas causas de alteración del alimento o descomposición.

El deterioro microbiano de los alimentos tiene un papel determinante en la conservación de los alimentos, ya que puede producir pérdidas económicas sustanciales, tanto para la industria alimentaria (que puede llegar a generar pérdidas de materias primas y de algunos sub-productos elaborados antes de su comercialización, deterioro de la imagen de marca) así como para distribuidores y usuarios consumidores (tales como deterioro de productos después de su adquisición y antes de su consumo, problemas de sanidad, etc.).

Se sabe con certeza que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos y, por otra parte, estos alimentos alterados pueden resultar muy perjudiciales para la salud del consumidor, por lo tanto el primer empleo es el de evitar el deterioro.

En la tabla 2, se describe la acción que ejercen los diferentes métodos de conservación de alimentos sobre los microorganismos.



Tabla 2. Clasificación de los métodos de conservación.

<b>Acción sobre los microorganismos</b>	<b>Forma de actuación</b>	<b>Método empleado</b>
<b>Destrucción</b>	Por acción del calor	Pasteurización Esterilización
	Por radiaciones ionizantes	Irradiación
	Por acción de antisépticos	Alcohol Ácidos Conservadores químicos o naturales.
	Por acción mecánica	Altas presiones
	Por acción mixta: Calor-mecánica	Cocción-extrusión
<b>Efecto barrera</b>	Se conserva por las bajas Temperaturas	Refrigeración Congelación
	Por utilización de atmósferas pobres en oxígeno (O <sub>2</sub> )	Vacío Mezcla de gases inertes Atmósferas controladas
	Por reducción del contenido de agua	Deshidratación Liofilización Concentración
	Protección por incorporación y recubrimiento con inhibidores	Salazón Inmersión en salmuera Recubrimientos con materias grasas Recubrimientos con azúcar (frutas escarchadas) Inmersión en ácidos (como el acético)
<b>Eliminación</b>	Por separación física	Filtración esterilizante Ultrafiltración

(Bello, 2000).

Es importante destacar que los principios básicos del procesamiento se pueden aplicar a la gran mayoría de los alimentos, aunque existen amplias y claras diferencias entre los distintos grupos, por lo que la adaptación de procesos creados para un alimento en particular no siempre resultan convenientes para otros.

Para la conservación de los alimentos también se requieren métodos químicos, los cuales se utilizan para aumentar su vida útil; son muy utilizados por la industria alimentaria, porque de este modo posibilita tener mayor acceso y mayor durabilidad de los productos.



Los métodos de conservación química se pueden clasificar en dos grupos: los que conservan las propiedades naturales del alimento y aquellos que alteran sus características organolépticas.

1) Métodos que no alteran las cualidades organolépticas de los alimentos: aquí se incluyen los conservadores químicos y aquellos compuestos con propiedad antiséptica.

2) Métodos que alteran las cualidades organolépticas de los alimentos, como:

a. Agregar sal, se incluye el proceso de salazón y curado.

b. Proceso de ahumado.

c. Agregar algunos tipos de ácidos naturales, que producen métodos como el marinado, diversas formas de adobo, encurtidos y escabeche.

d. Agregar cantidades controladas de azúcar: mermelada, grajeado y glaseado.

e. Métodos biológicos: fermentaciones (alcohólica, acética, butírica, láctica) (Caps, 2003).

### **Fermentaciones.**

La conservación por fermentación depende de la conversión de azúcares a ácidos por la acción de los microorganismos y de la imposibilidad de las bacterias de crecer en un medio ácido (Aguilar, 2012).

Se aprovecha la microbiota natural, no patógena, que contienen los alimentos, para crear productos con sabores muy característicos y apariencia muy peculiar que gustan al consumidor, y debido a esto se propicia la conservación del alimento.

La fermentación se genera por algunas bacterias, algunos tipos de levaduras, ciertos mohos, entre otros. La fermentación se usa de manera positiva en la industria, incluso algunos productos necesitan de este proceso para lograr un sabor único; por ejemplo, el vino; una gran variedad de vinagres; la cerveza en todos sus derivados; derivados de la



leche, como el yogurt; derivados de la carne como los embutidos; productos de panificación; aceitunas, etc. En la industria se aplica constantemente en condimentos líquidos como la salsa de soya y en las bebidas alcohólicas.

Existen cuatro tipos de fermentaciones que se aplican en la industria alimentaria, y dependen del alimento a conservar:

- Fermentación acética: es la fermentación bacteriana por *Acetobacter*, que transforma el alcohol en ácido acético para la obtención de energía.
- Fermentación alcohólica: se origina por la actividad de algunas bacterias heterofermentativas o levaduras que procesan los azúcares para obtener etanol, se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, como el vino, la cerveza, la sidra, etc.
- Fermentación butírica: este tipo de fermentación es realizada por ciertas especies de *Clostridium* en la que la glucosa es fermentada con la formación de ácido acético, ácido butírico, CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.
- Fermentación láctica: utiliza glucosa para obtener energía, siendo el ácido láctico uno de los productos más importantes. Con esta fermentación, se elaboran los yogures, los quesos, etc. (Desrosier, 1981).

### **Enfermedades transmitidas por alimentos.**

Las enfermedades alimentarias son aquellas que se atribuyen a un alimento específico, a una sustancia que se le ha incorporado o a su contaminación a través de recipientes mientras se prepara o distribuye. A través de los alimentos se pueden transmitir múltiples enfermedades. En la mayoría de los países esta situación constituye uno de los mayores problemas de salud pública. Los alimentos pueden transmitir enfermedades debido a contaminaciones físicas, químicas o biológicas.



## **Tipos de enfermedades de transmisión alimentaria.**

- Intoxicaciones alimentarias: causadas por el consumo de alimentos que contienen sustancias tóxicas, como restos de pesticidas en vegetales o productos tóxicos formados por la descomposición del propio alimento.
- Infecciones alimentarias: derivadas de la ingestión de los alimentos contaminados. Su causa son microorganismos presentes en el producto como *Escherichia coli*, *Vibrio*, *Campylobacter jejuni*, etc.
- Toxiinfecciones alimentarias: originadas por la presencia en los alimentos de bacterias patógenas que, además de reproducirse, producen toxinas (Ruiz, 2017). Las bacterias son de las más perjudiciales, tanto por su abundancia como por su elevada tasa de reproducción; pueden producir toxinas (*Clostridium*) o ser infecciosas por ellas mismas (*Salmonella*, *Listeria*).

El aumento de las enfermedades transmitidas por alimentos podría ser real, debido a las tendencias observadas en hábitos alimentarios, como el consumo de cierto tipo de alimentos, el aumento de las poblaciones en riesgo, como es el caso de personas inmunodeprimidas, o la globalización de los mercados que hacen posible que un alimento contaminado con un patógeno produzca una de estas enfermedades en un país diferente al de origen.

La listeriosis es una infección bacteriana que se produce en animales y humanos causada por *Listeria monocytogenes* (Posfay, 2009). 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 (Orsi, 2011).

*L. monocytogenes* es un bacilo Gram (+), anaerobio facultativo, con capacidad de formar biopelículas y de sobrevivir a diferentes temperaturas (>0-45 °C), pH extremo (4.3-9.6) y altas concentraciones



de sal (>20%), características que le permiten crecer en suelo, cuerpos de agua, agua residual y alimentos (Zunabovic *et al.*, 2011).

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 *et al.*, 2007) y c) falta de buenas prácticas de higiene y de programas de monitoreo en la cadena alimentaria (Zunabovic *et al.*, 2011).

En México no existen datos exactos sobre la incidencia de la listeriosis ya que la información con la que se cuenta es insuficiente. Al respecto, la Dirección Nacional de Epidemiología no reporta un aumento o un número exacto de casos de listeriosis en una revisión de 1995 a 2016 (Ruiz, 2017). Pero en las noticias internacionales se reportó uno de los retiros más grandes de alimentos al abarcar más de 400 productos congelados de la marca CRF Frozen Foods de Pasco, Washington que fueron enviados a México, Canadá y Estados Unidos; vendidos bajo más de 40 marcas en tiendas como Costco, Target, Trader Joe's y Safeway. Hasta agosto de 2016, en California, ocho personas fueron infectadas por listeria genéticamente similar a la encontrada en las verduras CRF y dos murieron en Maryland y Washington, aunque listeria no fue la causa principal de muerte (Por riesgo de Listeria retiran alimentos congelados en México, 2015).

### **Alimentos fermentados (pozol).**

Es común que los microorganismos de un alimento fermentado constituyan una microbiota compleja, constituida por una gran cantidad y diversidad de microorganismos. Como consecuencia del estudio de los alimentos fermentados, no sólo se han encontrado elementos que



fortalecen su importancia nutrimental en la dieta de las regiones del país en las que se consumen, sino que también se han descubierto microorganismos con actividades interesantes, tanto desde el punto de vista científico como tecnológico (Wacher, 2014).

El pozol es un alimento fermentado tradicional del sureste de México, que se elabora a partir de masa de maíz nixtamalizado, a la que se le puede o no adicionar algún saborizante, sea sal, miel, azúcar, cacao o chile (Nuraida *et al.*, 1995). Se consume principalmente en los estados de Tabasco, Chiapas, Oaxaca, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Ampe *et al.*, 1999 Méndez-Albores *et al.*, 2004).

El pozol se elabora a partir de granos de maíz, los cuales se nixtamalizan con cal durante una hora, para ser enjuagados con agua fría; los granos resultantes se les llama nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se obtiene una masa heterogénea a la cual se le da forma de bola manualmente. Estas bolas se envuelvan en hojas de plátano para evitar la desecación y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días, dependiendo de las preferencias del consumidor (Sainz *et al.*, 2001).

Las bacterias ácido lácticas son el grupo dominante en el pozol durante todas las etapas de fermentación. En trabajos previos se han logrado encontrar bacterias ácido lácticas no amilolíticas: *Weissella confusa*, *Lactobacillus delbrueckii*, entre otras (Ben Omar *et al.*, 2000), bacterias amilolíticas como *Streptococcus bovis*, *Streptococcus macedonicus*, *Streptococcus lutetiensis*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus* (Díaz-Ruiz *et al.*, 2003).

### **Bacterias lácticas.**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) se han empleado históricamente en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, como agentes de bioconservación. Se definen como microorganismos Gram positivos,



generalmente inmóviles, no esporulados, no pigmentados y no reductores de nitratos. Son anaerobios aerotolerantes ya que, aunque en general carecen de catalasa, poseen peroxidasas y superóxido dismutasas que descomponen, respectivamente, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  y el  $\text{O}_2^-$  que se forman en condiciones de aerobiosis.

La mayoría de las bacterias lácticas sólo pueden obtener energía a partir de azúcares y otros compuestos relacionados. Debido a su limitada capacidad biosintética son muy exigentes nutricionalmente y requieren factores de crecimiento complejos como aminoácidos, vitaminas, purinas y pirimidinas (Dellaglio *et al.*, 1994).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) que incluyen al género de *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Pediococcus* están presentes en alimentos fermentados, donde son de gran importancia por la producción de diferentes compuestos que aportan sabor, aroma y metabolitos inhibitorios como las bacteriocinas que son péptidos o proteínas producidas a nivel ribosomal que pueden sufrir modificaciones post-traduccionales y que pueden tener actividad antimicrobiana frente a otras bacterias (Axelsson, 1993).

BAL muestran una amplia gama de actividades antimicrobianas. Entre estas actividades, la producción de ácido láctico y el ácido acético es de las más importantes. Sin embargo, se sabe que ciertas cepas de BAL producen moléculas bioactivas tales como etanol, ácido fórmico, ácidos grasos, peróxido de hidrógeno, diacetilo, reuterina y reuteriicina.

Muchas cepas también producen bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) y enzimas que degradan la pared celular bacteriana, estas tres últimas son de naturaleza proteínica y contribuyen a la preservación y seguridad de los alimentos. Dichas proteínas pueden ser producidas por la bacteria en el alimento directamente durante la fermentación, o se pueden adicionar en su forma purificada (Olvera *et al.*, 2015; De Vuyst *et al.*, 1994).



## **Influencia de los factores ambientales sobre el crecimiento bacteriano.**

El crecimiento bacteriano está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente. El conocimiento de estas influencias ambientales permite controlar el crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos (Prescott *et al.*, 1999).

Numerosos factores afectan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos y, a menudo, sus interacciones tienen un efecto significativo sinérgico o antagónico sobre el crecimiento (Eifert *et al.*, 1996). Entre los varios factores que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano se pueden destacar la temperatura, el pH, los solutos y la actividad de agua ( $a_w$ ), la concentración de oxígeno, la presión y la radiación (McMeekin *et al.*, 1993).

### **Temperatura.**

Probablemente la temperatura sea el factor más importante que afectan la viabilidad y el desarrollo microbiano (ICMSF, 1983). El factor que más influye sobre el efecto de la temperatura en el crecimiento es la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas, y el microorganismo crece más rápidamente. A partir de cierto punto, un mayor incremento de la temperatura disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas lo suficiente elevadas son letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas (Prescott *et al.*, 1999; Montville, 2000).

En función de la temperatura óptima de crecimiento, los microorganismos pueden ser clasificados en los siguientes grupos: psicrófilos, mesófilos, termófilos e hipertermófilos. Las bacterias ácido lácticas se encuentran en la clasificación de bacterias mesófilas, que son aquellas que tienen su



mayor velocidad de crecimiento a temperaturas comprendidas entre 25 y 40 °C.

### **pH.**

Cada especie tiene un intervalo definido de pH para su crecimiento y un pH óptimo para su crecimiento. Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios en un amplio intervalo de valores de pH, su tolerancia tiene un límite. Variaciones intensas en el pH externo pueden modificar también la ionización de las moléculas de los nutrientes, disminuyendo, por ello, su disponibilidad para el organismo (Prescott *et al.*, 1999).

La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH entre 5 y 9, y son más comunes los microorganismos con un pH óptimo situado entre estos valores por la actividad enzimática para su crecimiento. Pocas especies pueden crecer en medios con valores de pH inferiores a 2 o superiores a 10. Comúnmente los microorganismos tienen un pH óptimo para su crecimiento entre 6 y 8. Son considerados neutrófilos (Madigan *et al.*, 1997).

### **Proteínas y péptidos con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas.**

Además de la producción de ácido láctico u otros ácidos orgánicos (acético y propiónico), las BAL pueden producir compuestos de diferente naturaleza con actividad antibacteriana. Algunos de esos compuestos son: peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, reuterina, reuteriicina, bacteriocinas, BLIS (Bacteriocin Like Inhibitor Substances) y peptidoglucano hidrolasas (Moreno *et al.*, 2002; Kang *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2004). De los cuales, los últimos tres son de naturaleza proteínica.

### **Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas son sustancias antimicrobianas de naturaleza peptídica y activas, por lo general, frente a microorganismos relacionados



taxonómicamente con la especie productora (Tagg *et al.*, 1976). Existe una gran diversidad en cuanto a su tamaño y al número de subunidades que componen la molécula activa, su espectro de inhibición puede ser en ocasiones bastante amplio, no siempre requieren de receptores específicos para su acción bactericida y sus determinantes genéticos pueden localizarse tanto en el cromosoma como en plásmidos (Tagg *et al.*, 1976; Monteville y Kaiser, 1993; Jack *et al.*, 1995).

Actualmente se conoce la estructura primaria de numerosas bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, por su secuenciación directa de 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  $\beta$ -metil lantionina y sus precursores dehidroalanina y dehidrobutirina) en la forma activa de aquéllas que reciben el nombre genérico de lantibióticos. Están conformadas por puentes disulfuro, tioéter o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoelectricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter *et al.*, 2005). 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):

- Lantibióticos (Clase I): péptidos pequeños (<5kDa), termoestables. Éstos se generan postraduccionalmente por deshidratación de serina y treonina para dar dehidroalanina y dehidrobutirina, respectivamente. Los lantibióticos Tipo A son péptidos largos con carga neta positiva que ejercen su actividad formando poros en las membranas bacterianas. Los lantibióticos Tipo B son péptidos globulares más pequeños sin carga o con carga neta negativa y su actividad antimicrobiana se relaciona con la inhibición de enzimas específicas.



- Clase II: se encuentran péptidos que no contienen lantionina, son termoestables y pequeños (<10 kDa), representan al grupo más grande de bacteriocinas que se subdivide en tres subgrupos: Clase IIa, Clase IIb y Clase IIc. En la Clase IIa se encuentran péptidos como la pediocina que es uno de los grupos que más atención ha recibido por su actividad anti-Listeria (Ennahar *et al.*, 2000). La Clase IIb incluye bacteriocinas que requieren un sistema de dos péptidos diferentes para ejercer actividad antimicrobiana. La Clase IIc contiene los péptidos restantes de esta clase y corresponden a bacteriocinas secretadas por el sistema sec dependiente.
- Clase III: de bacteriocinas que no se encuentran bien caracterizadas, incluye proteínas grandes (30 kDa) y termolábiles, y por esta característica tienen menor interés para su aplicación en alimentos.
- Clase IV: corresponde a las bacteriocinas complejas que requieren carbohidratos o lípidos para su actividad.

Algunos ejemplos representativos de las bacteriocinas de los grupos descritos se observan en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas de bacterias Gram positivas.

<b>Bacteriocinas de bacterias Gram positivas</b>	
<b>Bactericinas</b>	<b>Microorganismo productor</b>
<b>Clase I. Tipo A. Lantibióticos</b>	
Nisina	<i>Lactococcus lactis</i>
Lactocina	<i>Lactobacillus sake</i>
Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<b>Clase I. Tipo B Lantibióticos</b>	
Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>
Duramycina	<i>S. cinnamoneus</i>
<b>Clase IIa</b>	
Pediocina PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilactici</i>
Sakacina A	<i>L. sake</i>

Leucocina A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>
Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>
<b>Clase IIb</b>	
Lactococina G	<i>L. lactis</i>
Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>
<b>Clase IIc</b>	
Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Enterocina P	<i>E. faecium</i>
<b>Clase III</b>	
Helveticina J	<i>Lactobacillus heleveticus</i>

Modificado de Chen y Hoover, 2003.

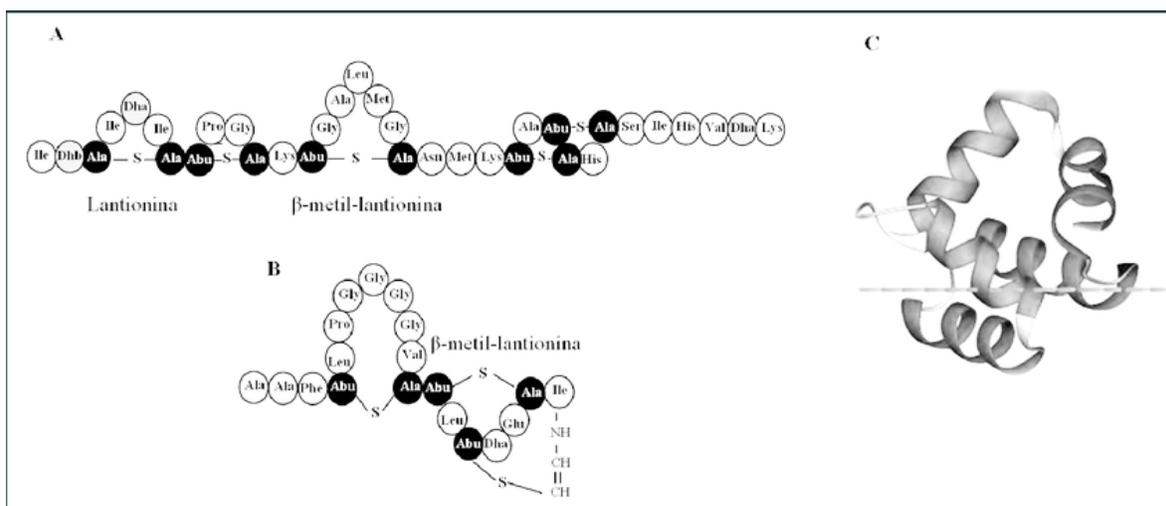


Figura 1. Estructura de diversas bacteriocinas de bacterias Gram positivas. Estructura globular de los lantibióticos nisina (A) y mersacidina (B). Los residuos de lantionina se indican en negro y como Ala—S—Ala. Los residuos de  $\beta$ -metil-lantionina se muestran en negro y como Abu—S—Ala 8, 9. C) Estructura  $\alpha$ -helicoidal de la enterocina AS-48 de 70 residuos. Se muestra su estructura cíclica, con los extremos amino y carboxilo unidos por un enlace peptídico 11.

Existen numerosas bacteriocinas producidas por BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, como la nisina que es producida por *Lactococcus lactis*, la cual es la única bacteriocina reconocida por la FDA como GRAS (Generally Recognized As Safe); el cual es un péptido de peso molecular menor de 5 kDa y está compuesta aproximadamente por 34



residuos de aminoácidos que está dentro de la clasificación de bacteriocinas de clase I que son los lantibióticos (Hurst, 1981).

### Método de acción.

El blanco primario de acción de las bacteriocinas es la membrana plasmática. Éstas alteran la permeabilidad selectiva de la membrana de las células vegetativas sensibles, provocando la inmediata e inespecífica liberación de iones, compuestos de bajo peso molecular y algo más tarde del ATP intracelular. Estas alteraciones provocan la disipación completa o parcial de la fuerza protón motriz (PMF) ocasionando desórdenes metabólicos secundarios que, en último término, inhiben la generación de energía y la síntesis de macromoléculas, lo que supone la muerte celular (Montville *et al.*, 1993). A continuación (figura 2) se muestra el modelo para la formación de poros por la nisina, donde: A) Un monómero o estructura anfifílica de la nisina se une a la membrana de las células sensibles; después se inserta dentro de la membrana y forma agregados que conforman los poros. B) La nisina (catión) se une a fosfolípidos aniónicos en la membrana celular; la nisina se inserta dentro, lo cual provoca la unión de ésta con la superficie de lípidos (Moll, 1996).

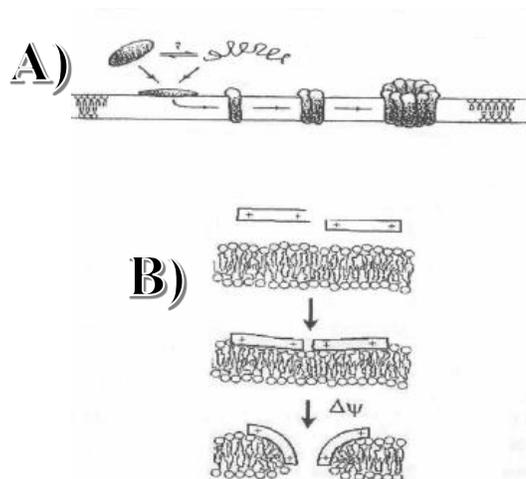


Figura 2. Modelo de formación de poros por nisina (Moll, 1996).



En general, los poros son inespecíficos y permiten la salida de cualquier soluto intracitoplasmático, únicamente limitado por el tamaño. No obstante, en algunas ocasiones, como ocurre con la lactococina G, el poro generado es específico para iones  $K^+$  (Moll *et al.*, 1996).

### **Peptidoglucano hidrolasas.**

Uno de los elementos más importantes de la célula bacteriana es la pared celular, la cual es la responsable del mantenimiento de la forma celular y la protección contra la lisis osmótica.

En las bacterias Gram-positivas, la pared celular contiene una capa gruesa de peptidoglucano la cual forma múltiples capas y presenta una conformación tridimensional que origina una pared celular muy fuerte y rígida, además se asocian a otros compuestos como ácidos teicóicos y lipoteicóicos y/o polisacáridos. En cambio, el peptidoglucano de la pared celular de las bacterias Gram-negativas constituye una sola capa delgada, la cual se encuentra rodeada por una segunda membrana lipídica exterior que contiene lipopolisacáridos y lipoproteínas, en este caso la capa de peptidoglucano se une a la membrana externa mediante lipoproteínas (Richards-Granados, 2017).

Durante todo su crecimiento, las células necesitan romper de manera controlada los enlaces del peptidoglucano. Las enzimas responsables de este proceso son conocidas como peptidoglucano hidrolasas o PGHs (Eckert *et al.*, 2006). Las PGHs están involucradas en un gran número de funciones que requieren la modificación de la red rígida del peptidoglucano durante el crecimiento y la división celular. Algunas de estas funciones incluyen la regulación del crecimiento de la pared celular, el intercambio de unidades de peptidoglucano durante el crecimiento, la separación de las células hijas durante la división y la autólisis que generalmente se induce en condiciones adversas como la falta de nutrientes. Algunas PGHs especializadas amplían los poros en el

peptidoglucano para el ensamblaje de grandes complejos que atraviesan las envolturas celulares (pili, flagelos, sistemas de secreción), u otras degradan el peptidoglucano durante la esporulación o la germinación. En bacterias patógenas juegan un papel importante en la adhesión y en la amplificación de la respuesta inflamatoria al liberar péptidos. Además, las PGHs están involucradas en los fenómenos de lisis de poblaciones microbianas (Lortal y Chapot-Chartier, 2005; Eckert *et al.*, 2006; Vollmer *et al.*, 2008).

### Clasificación de peptidoglucano hidrolasas.

Se clasifican por el tipo de enlace que hidrolizan en el peptidoglucano (figura 3).

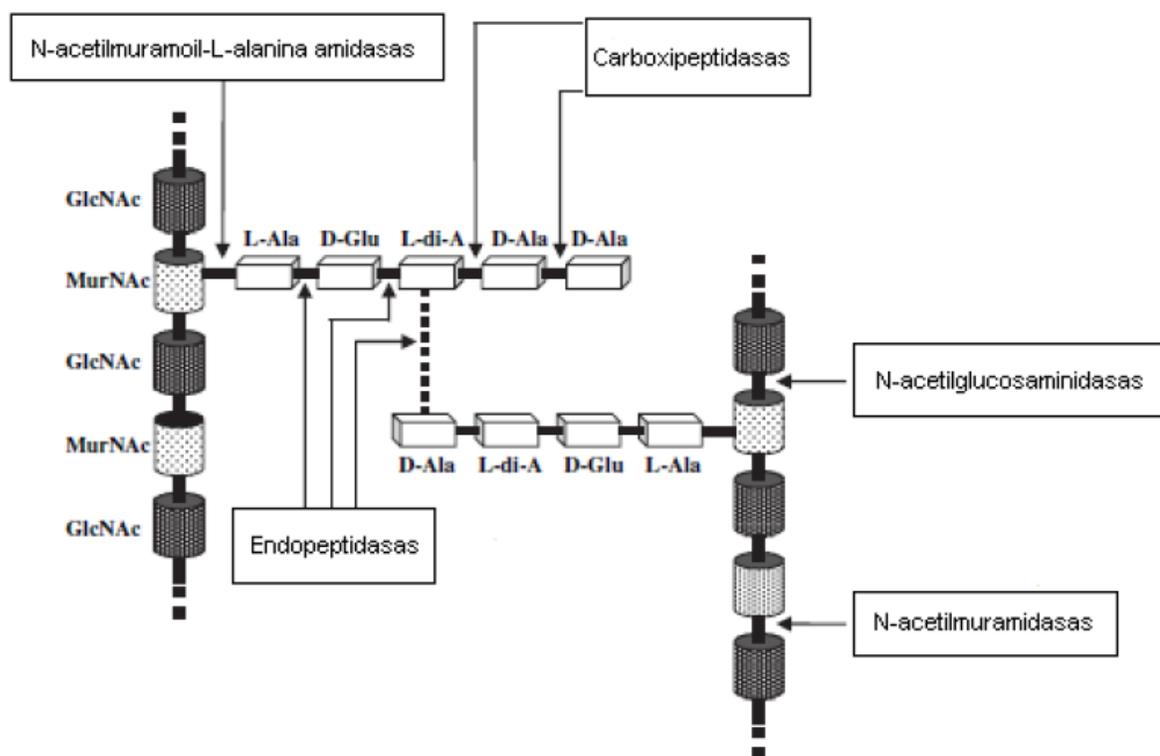


Figura 3. Estructura del peptidoglucano y especificidad por sustrato de las PGHs (adaptado de Layec *et al.*, 2008).

Las N-acetilmuramoil-L-alanina amidasas rompen el enlace amida entre MurNAc y la L-alanina del péptido. Las peptidasas son capaces de



hidrolizar el último aminoácido del extremo carboxilo de los péptidos (carboxipeptidasas), o de romper completamente los puentes formados por los péptidos (endopeptidasas). Las *N*-acetilglucoaminidasas y las *N*-acetilmuramididasas hidrolizan los enlaces  $\beta$ -1,4 de la cadena de glicanos. Las *N*-acetilglucosaminidasas lo hacen dejando un extremo GlcNAc reductor, mientras que las *N*-acetilglucosaminidasas rompen el enlace entre MurNAc y GlcNAc, dejando un libre un extremo MurNAc reductor, llamadas lisozimas, o formando un anillo 1,6-anhidro en MurNAc conocidas como transglicosilasas líticas (Vollmer *et al.*, 2008; Layec *et al.*, 2008).

Las PGHs se han propuesto como alternativa o herramienta complementaria para combatir las enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos, que se propagan rápidamente y se asocian con pérdidas económicas e incluso la muerte (Fischetti, 2010).

El uso de PGHs puede ayudar en la eliminación de colonización bacteriana de la mucosa gastrointestinal y el control de infecciones causadas por bacterias patógenas presentes en los alimentos (Hermoso *et al.*, 2007). Cuando se añaden a productos alimenticios terminados, estas enzimas líticas prolongan su vida útil, previenen el deterioro, inhiben el crecimiento de microorganismos indeseables y mejoran las propiedades organolépticas del producto final. Un ejemplo específico del uso de PGH en la industria alimentaria es la lisozima, que es una *N*-acetilmuramidasa, utilizada por plantas y animales como mecanismo de defensa contra las bacterias patógenas y generalmente considerada un aditivo alimentario no objetable (Nakimbugwe *et al.*, 2006; Maidment *et al.*, 2009).

### **Producción y purificación de sustancias antimicrobianas.**

Aunque las bacteriocinas pueden producirse en la matriz alimentaria durante la fermentación de alimentos, las bacteriocinas de LAB pueden producirse en cantidades mucho mayores durante fermentaciones *in vitro*



en condiciones físicas y químicas óptimas (Leroy *et al.*, 2005). La mayor producción *in vitro* se debe a la ausencia de factores limitantes, tales como fuertes limitaciones de difusión, inactivación por las proteasas, y la adsorción a partículas de alimentos (Leroy *et al.*, 2000). Sin embargo, incluso durante la fermentación controlada en los experimentos existen diferencias considerables en la actividad. Se obtienen diferentes rendimientos y se observa una marcada influencia de las condiciones del proceso sobre la actividad de la bacteriocina obtenida. Por ejemplo, la temperatura, el pH (Lejeune *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1999; Van den Berghe *et al.*, 2006), así como la disponibilidad de nutrientes (Callewaert *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2001; Verluyten *et al.*, 2004) parecen jugar un papel crucial en la producción de bacteriocinas, mientras que la presencia de cantidades elevadas de cloruro de sodio generalmente disminuye los niveles de producción (Leroy *et al.*, 1999; Verluyten *et al.*, 2004).

En general, las condiciones de cultivo afectan directamente a la producción de bacteriocina como tal (producción específica de bacteriocina en particular) e indirectamente a través de la producción de biomasa. Esto debe explicarse por el hecho de que la producción de bacteriocina es un factor fisiológico dependiente del crecimiento, por lo tanto sigue la cinética de metabolito primario (De Vuyst *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1998; Leroy *et al.*, 1999).

Dado que las bacteriocinas forman un grupo heterogéneo de sustancias, los protocolos específicos de purificación generalmente deben ser diseñados para cada uno de ellas, por lo que sólo unas pocas bacteriocinas han sido purificadas, tal es el caso de la nisina. Tres métodos principales para la purificación de bacteriocinas pueden distinguirse según su estructura bioquímica. En primer lugar, la purificación puede realizarse por un método convencional que se basa en una serie bastante laboriosa de etapas de precipitación de sulfato de amonio, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, filtración en gel y cromatografía líquida de alta



presión de fase inversa (Mørtvedt *et al.*, 1991; Tichaczek *et al.*, 1992; Parente *et al.*, 1999).

En segundo lugar, un protocolo simple de tres pasos se ha desarrollado, incluyendo (i) la precipitación con sulfato de amonio, (ii) extracción / precipitación de cloroformo / metanol y (iii) cromatografía líquida de alta presión de fase inversa.

Tercero, las bacteriocinas pueden aislarse a través de una única operación unitaria, es decir, adsorción en lecho expandido, usando un gel de interacción hidrófoba, después de maximizar la biodisponibilidad de la bacteriocina a través del ajuste del pH del medio de fermentación en bruto (Callewaert *et al.*, 1999; Foulquié *et al.*, 2001).

Siguiendo estos dos últimos métodos, que son más rápidos que el primer método convencional, se han purificado con éxito varias bacteriocinas con un interesante potencial industrial, tales como las bacteriocinas de clase II amilovorina L (producidas por *Lactobacillus amylovorus* DCE 471) y varias enterocinas por las cepas *Enterococcus faecium* RZS C5, RZS C13 y FAIR-E 406), y el macancocino lantibiótico (producido por *Streptococcus macedonicus* ACA - DC 198) (Callewaert *et al.*, 1999; Foulquie *et al.*, 2002; Foulquie *et al.*, 2003; Georgalaki *et al.*, 2002).



## Justificación

La conservación de los alimentos es una batalla constante contra los microorganismos que alteran los alimentos o que los hacen inseguros. A pesar de las tecnologías disponibles, la industria alimentaria investiga cada vez más con la finalidad de modificar, o incluso sustituir, las técnicas de conservación tradicionales (tratamientos térmicos intensos, salado, acidificación, deshidratación y conservación química) por nuevas tecnologías.

Los avances científicos están permitiendo encontrar diferentes aplicaciones para la eliminación de gérmenes patógenos para mejorar la conservación. Las nuevas tecnologías en la conservación de alimentos van desde la aplicación de altas presiones, irradiación, ultrasonidos o la aplicación de campos electromagnéticos, el uso de bioconservadores, entre otros; así como todos aquellos sistemas de envasado y modificación de la atmósfera gaseosa y otras.

Uno de los conservadores naturales de importancia lo constituyen las bacteriocinas. Éstas son péptidos producidos por microorganismos como las bacterias lácticas, que tienen actividad antimicrobiana contra cepas relacionadas taxonómicamente con el microorganismo productor (Klaenhammer, 1988). Aunque el espectro inhibitorio de las bacteriocinas está restringido a bacterias Gram positivas, como algunos microorganismos patógenos que se encuentran en los alimentos tales como *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, se ha reportado que algunas bacteriocinas pueden inhibir también bacterias patógenas Gram negativas presentes en alimentos (De Vuyst y Vandamme, 1994). Entre sus propiedades bioquímicas se encuentra la estabilidad térmica (bacteriocinas de la Clase IIa) lo que permitiría aplicarlas en combinación



---

con tratamientos térmicos, tienen acción bactericida irreversible, presentan estabilidad en algunos alimentos y son biodegradables.



## Hipótesis

Si la cepa de *Streptococcus lutetiensis* A45212 presenta actividad antimicrobiana, entonces es posible que la sustancia asociada con el efecto antimicrobiano sea de naturaleza proteica, estable a altas temperaturas y de bajo peso molecular.

## Objetivos

**Objetivo general:** Evaluar las condiciones para la mayor producción de proteínas antimicrobianas por *S. lutetiensis* A45212 así como avanzar en la concentración y purificación parcial de dichas sustancias.

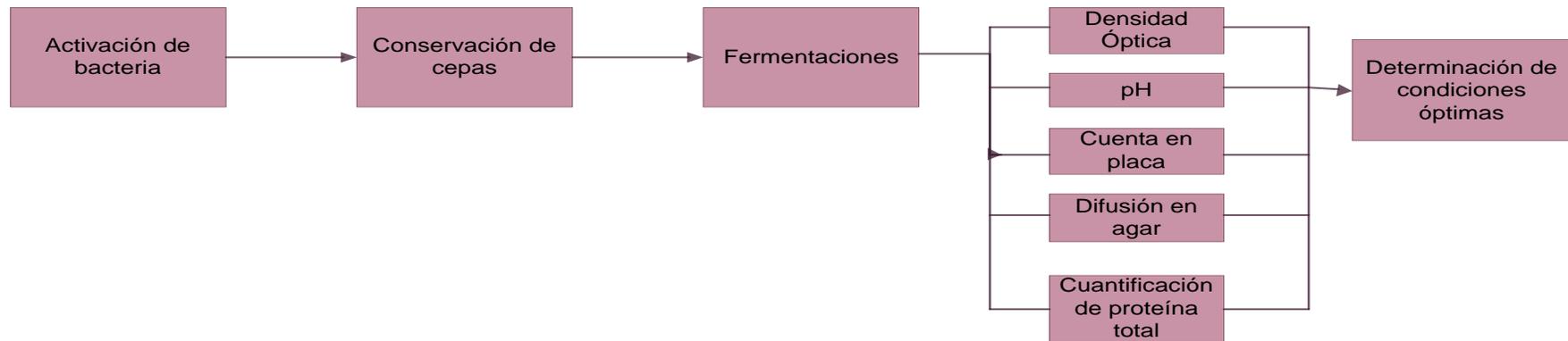
### Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de la temperatura en el crecimiento y en la producción de proteínas antimicrobianas producidas por *S. lutetiensis* A45212.
- Observar el efecto del pH inicial del medio de cultivo en el crecimiento y la producción de proteínas antimicrobianas producidas por *S. lutetiensis* A45212.
- Concentrar las proteínas antimicrobianas producidas por *S. lutetiensis* A45212 mediante precipitación fraccionada con sulfato de amonio.
- Estimar el peso molecular de las proteínas antimicrobianas producidas por *S. lutetiensis* A45212 mediante electroforesis SDS-PAGE.
- Corroborar la actividad antimicrobiana de las proteínas separadas mediante la electroforesis SDS-PAGE mediante un zimograma.

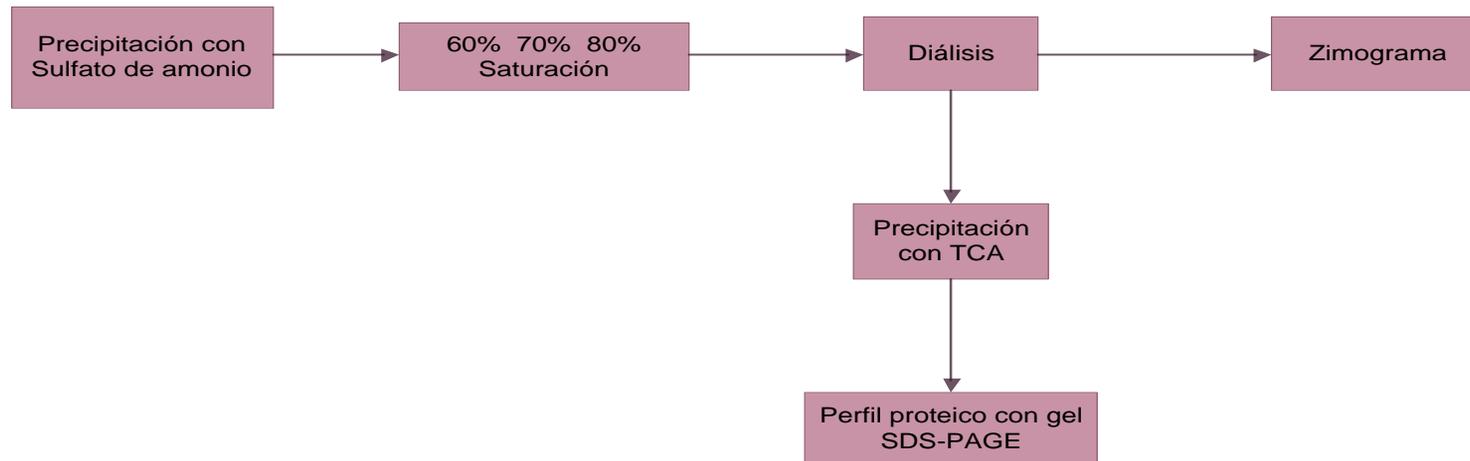


## Metodología.

### Diagrama general



### Separación de proteínas con actividad antimicrobiana.





### Cepas utilizadas.

En la tabla 4 se describen las cepas utilizadas en el presente trabajo, procedencia y medio de cultivo utilizados. Dichas cepas se conservan a -70 °C en medio MRS o BHI con glicerol al 20%.

Tabla 4. Descripción de las cepas utilizadas.

Cepa	Origen/Referencia	Medio de cultivo
<i>Streptococcus lutetiensis</i> A45212	Pozol, Villahermosa, Tabasco, (Díaz-Ruiz <i>et al</i> , 2003)	MRS
<i>Streptococcus spp.</i> 33*	Pozol, Villahermosa, Tabasco (Tavera, 2010).	MRS
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-103	Ceparío, Fac. de Química, UNAM	BHI
<i>Listeria innocua</i> 2	Ceparío, Fac. de Química, UNAM	BHI

\*control positivo, produce bacteriocina que inhibe a *L. monocytogenes* (Tavera, 2010).

### Activación de cepas.

Se tomaron 50 µL de la cepa en medio con glicerol al 20%, se inocularon en 5 mL de medio fresco indicado (Lactobacilli MRS Broth, Difco™ para las bacterias ácido lácticas y caldo BHI Oxoid™ para *L. monocytogenes*) y se incubaron a 30 °C o 37 °C, para bacterias lácticas o *L. monocytogenes* o *L. innocua*, respectivamente, por 24 h. Para comprobar la pureza de cada cepa se realizó una tinción de Gram y se observó al microscopio.

### Conservación de las cepas.

A partir de las cepas activadas y una vez comprobada la pureza, se hizo un segundo cultivo inoculado con 50 µL del cultivo anterior a 5 mL de medio fresco (MRS para bacterias lácticas y BHI para patógenos indicadores) y se incubó por 18 h, a las temperaturas indicadas



previamente. Se tomaron 1.5 mL del segundo cultivo, se centrifugó a 8000 RPM por 10 min a 4 °C y se conservó el botón, desechando el sobrenadante (se repitió 2 o 3 veces agregando el mismo volumen de cultivo en el mismo microtubo). El botón se lavó con 1.5 mL de solución salina estéril al 0.8%, eliminando el sobrenadante después de centrifugar a las mismas condiciones (se realizó este lavado 2 veces). Finalmente se agregaron 1.5 mL de medio óptimo (MRS o BHI) adicionado de glicerol al 20 %, en seguida se resuspendió el botón y se transfirió a criotubos para su conservación a -70 °C.

### **Determinación de actividad antimicrobiana de la cepa *S. lutetiensis* A45212 en diferentes condiciones de temperatura y de pH inicial en el medio MRS.**

#### **Reactivación de cepas.**

Se reactivaron las cepas de BAL en viales con 5 mL de medio MRS inoculado con 50µL del cultivo congelado se incubaron a 30 °C durante 24 h. Se realizó un segundo cultivo agregando 50 µL de inóculo del cultivo anterior y se incubó 18 h a 30 °C.

#### **Condiciones para el crecimiento y la producción de sustancias antimicrobianas por *S. lutetiensis* A45212.**

En la tabla 5 se detallan las condiciones de crecimiento en el medio MRS para la cepa *S. lutetiensis* A45212. Para evaluar el crecimiento y la producción de sustancias antimicrobianas, un matraz con 250 mL de medio MRS se inoculó al 1% con la cepa *S. lutetiensis* A45212 reactivada. Los matraces se incubaron 24 horas sin agitación, el ensayo se realizó por duplicado.



Tabla 5. Condiciones de pH inicial en el medio de fermentación y temperatura de incubación durante el crecimiento de la *S. lutetiensis* A45212.

<b>FERMENTACIÓN</b>	<b>pH inicial</b>	<b>Temperatura de incubación (°C)</b>
<b>1</b>	6.5	30
<b>2</b>	6.5	37
<b>3</b>	5.5*	30
<b>4</b>	7.5^	30
<b>5</b>	7.5^	37

\* Se ajustó con HCl 1N.

^ Se ajustó con NaOH 2M.

### **Evaluación del crecimiento de cepas en medio MRS.**

Para cada uno de los cultivos obtenidos, de acuerdo con la tabla 5, se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 1.5, 3.0, 4.5, 6.0, 7.5, 9.0, 10.5, 12 y 24 h de fermentación. En cada tiempo, se evaluó el crecimiento de la bacteria midiendo la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm en un espectrofotómetro (Theron Scientific, Genesys 10S Uv-Vis) y se cuantificó la bacteria mediante una cuenta en placa tal y como se describe a continuación.

Las cajas Petri con agar MRS se inocularon con 100µL del cultivo diluido (las diluciones se realizaron en 4.5 mL de solución salina estéril al 0.8% a partir de 0.5 mL de una alícuota tomada del medio de fermentación) y se extendió con varilla de vidrio estéril. Las cajas se incubaron a 30 °C por 24 h y se procedió a hacer el conteo de colonias típicas del género *Streptococcus spp.*, pequeñas, blancas y convexas y se reportaron como UFC (unidades formadoras de colonias) por mL de cultivo. Se consideraron representativas las cajas que tenían un número de colonias dentro del intervalo de sensibilidad del método, en este caso, entre 25 y 250 UFC y cuando el número de colonias por placa excedió de 250, se



contaron las colonias por cuadrante, se multiplicó por cuatro y se reportó con la leyenda "valor estimado (VE)" (Camacho *et al.*, 2009).

También se determinó el pH con un potenciómetro OAKTON pH 700. Se tomaron fracciones de 3.0 mL, que se congelaron a -20°C para hacer posteriormente la prueba de difusión en agar y la cuantificación de proteína.

### **Detección de actividad antimicrobiana mediante pruebas de difusión en agar.**

Para determinar el efecto antimicrobiano con las fracciones obtenidas de cada ensayo, en los diferentes tiempos de fermentación de la cepa *S. lutetiensis* A45212, se realizaron pruebas de difusión en agar tal como se describe a continuación.

En cajas Petri que contenían 15 mL de medio BHI tamponado se adicionó una sobrecapa (10 mL) de medio tamponado semisólido (tabla 6) inoculado al 1% con *L. monocytogenes* o *L. innocua* con un tiempo de crecimiento de 6 horas; con cilindros de vidrio estériles se formaron los pozos en la sobrecapa, a los que se les agregaron 80 µL de sobrenadante con las sustancias antimicrobianas. Dicho sobrenadante se obtuvo centrifugando (8000 RPM 10 min a 4 °C) las fracciones conservadas en congelación de los ensayos de cinética celular, previamente descritos. Se utilizó un control positivo, el sobrenadante del cultivo en medio MRS de la cepa 33 después de 24 h de incubación y un control negativo (medio MRS estéril). Las placas se incubaron a 37 °C por 24 h. Se midió el diámetro del halo de inhibición y se reportó en milímetros (mm).



Tabla 6. Composición de medio BHI tamponado (BHI-T) por litro. Prueba de difusión en agar (Tavera, 2010).

Componente	Placa	Sobrecapa
<b>Caldo BHI</b>	37 g	15 g
<b>Agar bacteriológico</b>	17 g	8 g
<b>Fosfato monobásico de sodio</b>	4.3 g	4 g
<b>Fosfato dibásico de sodio</b>	10 g	10 g
<b>Agua destilada</b>	1000 mL	1000 mL

### a) Determinación de proteína.

La concentración de proteína de cada fracción en estudio se determinó por el método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando un kit comercial (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent Cat. #500-0205) y albúmina sérica bovina como estándar.

### **Concentración y purificación parcial de sustancias antimicrobianas producidas por *S. lutetiensis* A45212.**

#### **Precipitación con sulfato de amonio y diálisis**

Se preparó un cultivo de 100 mL con *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS con pH inicial de 7.5 a 37 °C con 6 horas de incubación, tal como se refirió previamente. El cultivo obtenido se centrifugó a 10000 RPM a 4 °C por 15 minutos, eliminando la biomasa y conservando el sobrenadante. Mismo que se traspasó a un vaso de precipitados de 250 mL en una tina con una base de hielo y con agitación. Primero se agregaron lentamente 36.6 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (previamente pulverizado en un mortero de porcelana) para una precipitación al 60% de saturación, cuando la sal se disolvió el contenido del vaso se centrifugó a 10000 RPM a 4 °C por 15 minutos. Se repitió del mismo procedimiento con el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  para llegar a un porcentaje de saturación de 70% (se agregó 6.3 g de sulfato de amonio) y posteriormente 80% (se agregó 6.6 g); se centrifugó para separar el botón del sobrenadante, el botón se dializó con una membrana de celulosa



de 3.0 kDa (Spectra/Por 3 Dialysis Membrane) en amortiguador de fosfatos pH 7.6-0.1 M y agitando durante 24 horas a 4 °C, cambiando cada 4 horas el amortiguador. El botón de proteína obtenido se guardó en congelación a -20 °C para su análisis posterior.

### **Perfil de proteínas y zimógramas.**

#### **Determinación del peso molecular del compuesto antimicrobiano.**

Con la finalidad de obtener el perfil electroforético de los péptidos presentes en las fracciones obtenidas se realizó una precipitación con TCA (ácido tricloro acético) al 100%. Esta precipitación consistió en añadir a 1 mL de muestra dializada 250  $\mu$ L de TCA, dejando reposar 15 min en hielo; transcurrido este tiempo se centrifugó 5 minutos a 10000 RPM para eliminar el sobrenadante. Se agregaron 100  $\mu$ L de acetona fría al precipitado de proteína agitando en vortex para luego centrifugar como ya se mencionó anteriormente. Este lavado se repitió 2 veces. Para eliminar la acetona remanente se dejó evaporar en la campana de extracción y el precipitado obtenido se disolvió utilizando una disolución de urea 8 M y 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS) al 4% y el volumen mínimo necesario de NaOH 0.1 N para neutralizar la muestra (Nandakumar *et al.*, 2003), a la que se le adicionó un volumen equivalente de la disolución amortiguadora de muestra (Laemmli, 1970).

Para determinar el peso molecular de las proteínas se realizaron geles SDS-PAGE (gel concentrador 4% T, 2.6% C; gel separador 16.5% T, 2.6% C) (Anexo 2) con el equipo Mini-PROTEAN™ Tetra Cell, Bio-Rad. En un pozo se aplicó 8  $\mu$ L de estándares preteñidos de bajo peso molecular (EST) (Bio-Rad) y estándares preteñidos (ST) (Fermentas) y en el resto de los pozos se aplicaron 30  $\mu$ L de las fracciones de estudio. Se aplicó una diferencia de potencial de 100 V (Power Pac™ HV Power Supply, Bio-Rad) por 3 horas. Los geles se tiñeron con Azul de Coomassie G-250 (Bio-Rad)



por 2 horas en agitación constante, al terminar este tiempo se decantó la solución teñidora y se lavó el exceso con agua destilada, se le agregó la solución desteñidora 1 (Anexo 4) en agitación suave por 12 horas; en seguida se siguió el mismo procedimiento desde decantar hasta la agitación constante pero con la solución desteñidora 2 (Anexo 4).

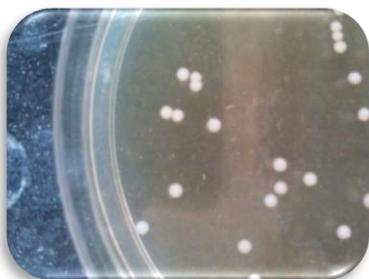
Para corroborar la actividad del compuesto antimicrobiano con el perfil electroforético de las fracciones en estudio producidos por *S. lutetiensis* A45212, se realizaron geles de acrilamida (gel concentrador 4% T, 2.6% C; gel separador 16.5% T, 2.6% C) con células de *Listeria innocua* y *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich, USA) (Anexo 3). Para la renaturalización de las proteínas, los geles se lavaron dos veces con agua desionizada durante 30 minutos cada uno con agitación suave (40 RPM). Posteriormente el gel se mantuvo en una disolución amortiguadora Tris-HCl 25 mM (pH 7.0) con Tritón al 1% a 30 °C durante toda la noche. El gel se tiñó con azul de metileno (Sigma-Aldrich) al 0.1% en KOH 0.01% y se removió el colorante con agua destilada.

## Resultados y discusión.

### Reactivación y conservación de la cepa *S. lutetiensis* A45212 y microorganismos patógenos indicadores.

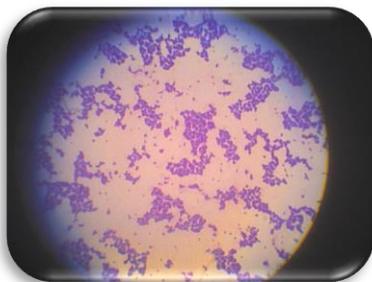
Al cultivo de *S. lutetiensis* A45212 reactivado se le determinó la pureza observando sus características macroscópicas y microscópicas. El análisis macroscópico en placas de MRS, mostró colonias color crema de morfología convexa, forma circular y de borde redondeado (figura 4) y el análisis microscópico mostró una morfología de cocos (sin agrupación definida) Gram positivos (figura 5).

Las bacterias indicadoras utilizadas a lo largo del proyecto fueron *L. monocytogenes* y *L. innocua* en ambos casos, los resultados de su análisis macroscópico mostraron colonias blancas o beige, cóncavas, circulares y el microscópico mostró una morfología de bacilos Gram positivos. Lo que indicó que las cepas se encontraban puras. Tanto la BAL como las bacterias indicadoras fueron conservadas en caldo MRS o BHI con glicerol, respectivamente, al 20% -70 °C.



MRS.

Figura 4. Colonias de *S. lutetiensis* A45212 en agar



A45212.

Figura 5. Vista al microscopio de *S. lutetiensis*



## Evaluación del efecto de la temperatura de fermentación para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana.

Se evaluaron dos diferentes temperaturas (30 °C y 37 °C) para la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 en el medio MRS, midiendo varios parámetros como el crecimiento (densidad óptica y cuenta viable), pH y actividad antimicrobiana.

A continuación se muestran los gráficos de los parámetros evaluados durante la fermentación (el valor de pH inicial 6.5 en medio MRS).

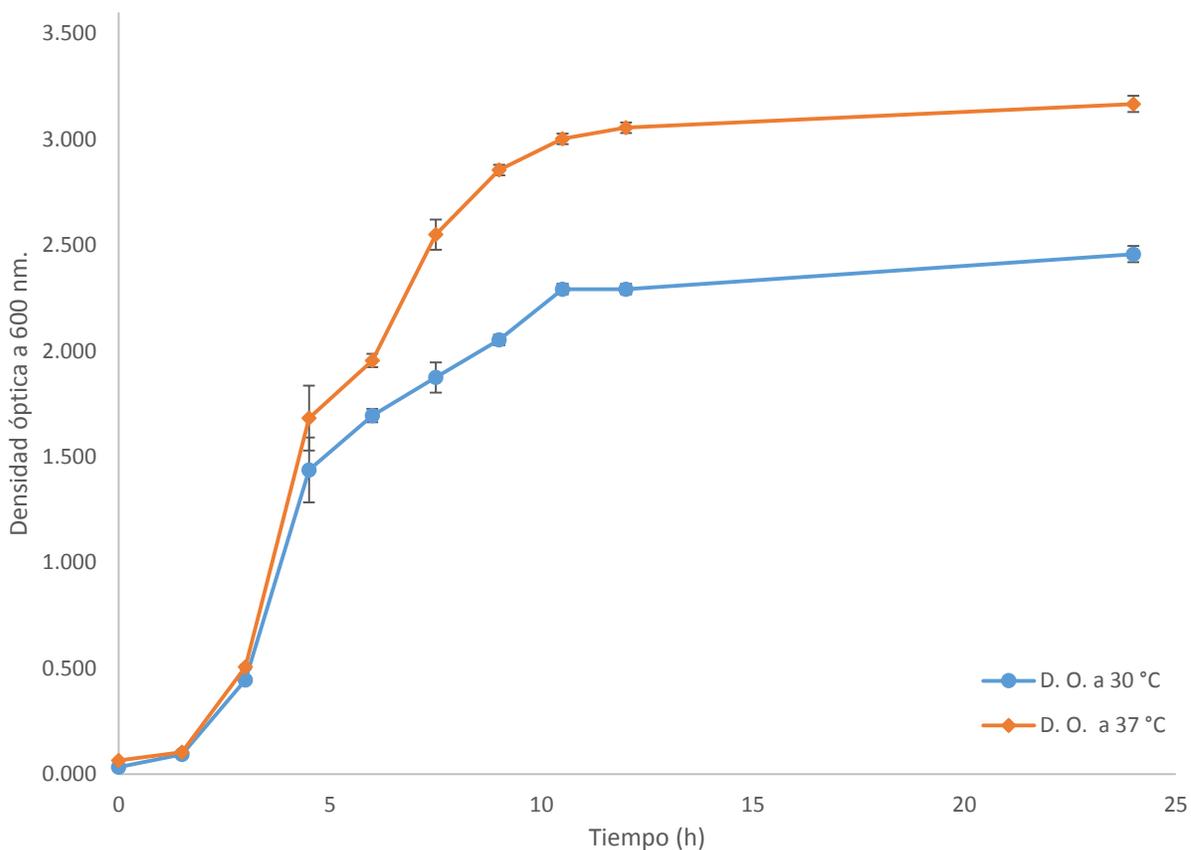


Figura 6. Efecto de la temperatura sobre el crecimiento (D.O) de *S. lutetiensis* A45212 en el medio MRS a pH 6.5.

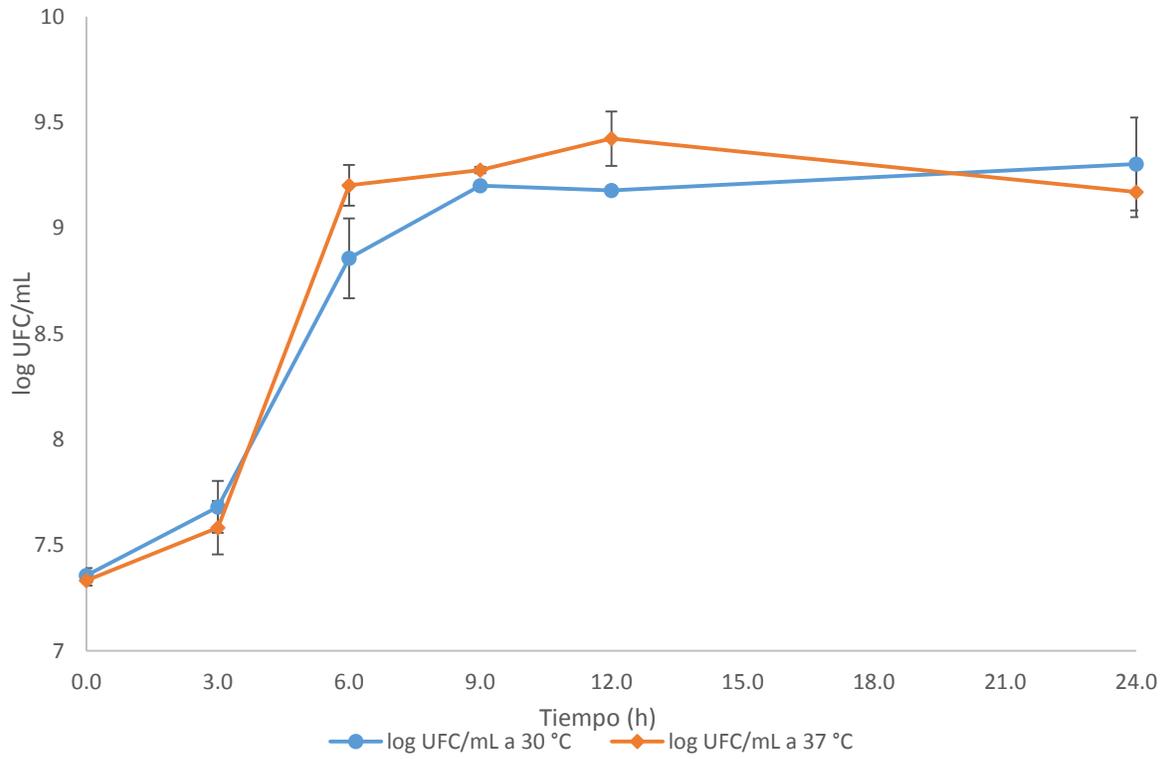


Figura 7. Efecto de la temperatura sobre la cuenta viable de *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS a pH 6.5.

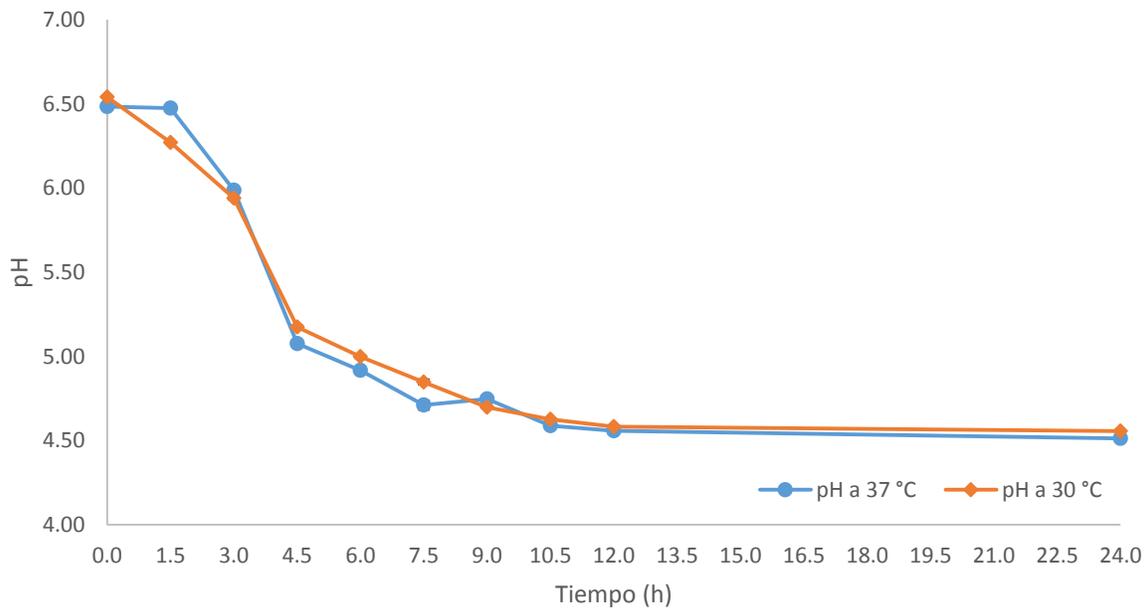


Figura 8. Valores de pH durante el crecimiento de *S. lutetiensis* A45212 a 30 °C y 37 °C en medio MRS.



Tabla 7. Actividad antimicrobiana de *S. lutetiensis* A45212 contra *L. monocytogenes* durante su crecimiento a 30 y 37 °C.

tiempo	mm de halos		Desviación estándar	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
<b>0</b>	13.75	21	0.95	0.81
<b>3</b>	21.25	24.75	0.50	0.50
<b>6</b>	<b>22</b>	<b>27.75</b>	0.00	0.50
<b>9</b>	21.75	27.25	0.50	0.50
<b>12</b>	21	26.26	0.00	0.95
<b>24</b>	20	25	0.00	0.81

Tabla 8. Concentración de proteína total en sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 durante su crecimiento a 30 y 37 °C.

tiempo	[µg de proteína total/mL de muestra]		Desviación estándar	
	30 °C	37 °C	30 °C	37 °C
<b>0</b>	175.92	179.89	1.06	4.00
<b>3</b>	171.21	175.36	7.20	24.81
<b>6</b>	<b>178</b>	177.81	8.80	26.68
<b>9</b>	168.38	<b>193.47</b>	6.40	2.40
<b>12</b>	155.74	190.64	0.80	13.87
<b>24</b>	170.45	186.68	1.86	5.06

En las figuras 6 y 7 se puede observar que la fase de latencia es de 0 a 3 horas en ambas temperaturas. En la fase de latencia las bacterias se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación del material genético (Montville, 2000); la duración de esta fase se ve afectada por variables como la identidad y el fenotipo de la bacteria (Buchanan y Cygnarowicz, 1990), el tamaño del inóculo (Baranyi y Roberts, 1994), la historia fisiológica de la población (McMeekin *et al.*, 1993) y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura (Zwietering *et al.*, 1994), el pH, la actividad acuosa y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990). En este caso no se observan



diferencias en la fase lag de crecimiento de la bacteria al incubar a 30 o 37 °C.

La fase exponencial de la célula se dio a partir de las 3.0 horas hasta las 10.5 horas, al incubar a 30 °C y se extendió hasta las 12 h a 37 °C (figura 7). Esta fase varía entre los distintos microorganismos. La fase exponencial es un indicador útil del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan *et al.*, 1997). En general se encontró que en el parámetro de densidad óptica descrito en la figura 6 existe un mayor valor (de 4.5 a 24 h) durante la fermentación a 37 °C que a los 30 °C. Se sugiere que el aumento de la velocidad de crecimiento con la temperatura se debe al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas con la temperatura (Martínez *et al.*, 2009). En general, los resultados de la concentración de bacterias (figura 7) coinciden con los de densidad óptica en la figura 6.

La mayoría de las bacterias lácticas son mesófilas y tienen un crecimiento óptimo entre 20 y 40 °C (Microbiology Procedure, 2007). A medida que el microorganismo crece, en ambas temperaturas, el pH baja como se observa en figura 8, el descenso de pH es muy parecido en ambas temperaturas, excepto en las primeras horas cuando se observa un descenso más acelerado a 30 que a 37 °C por la especificidad de temperaturas de las enzimas determinadas en la etapa de adaptación y crecimiento de la bacteria. Díaz-Ruiz (2003) reportó los parámetros cinéticos de *Streptococcus bovis* 25124 en medio MRS-almidón; la cual es una especie dominante durante la fermentación del pozol y tiene actividad amilolítica al igual que *S. lutetiensis* A45212 que también fue aislado de dicho alimento. *S. bovis* 25124 presentó un tiempo de latencia de 1.5 horas y una fase exponencial de 2 a 4 horas a una temperatura de 30 °C; estos datos concuerdan con los de este estudio. López (2005) trabajó



con bacterias lácticas amilolíticas del genero *Streptococcus* (*S. bovis* A12202 y *S. macedonicus* A45201) aisladas del pozol y siguió la cinética de crecimiento en el medio MRS-almidón de ambas bacterias a diferentes temperaturas (30, 37 y 40 °C). Determinó que la fermentación con *S. bovis* A12202 a 37 °C tiene un menor tiempo de latencia (0-2 horas) y la fase exponencial se prolonga media hora (2-8 horas) más que a 30 °C (0 a 3 horas etapa de latencia; 3-7.5 horas en la fase exponencial) y para *S. macedonicus* A45201 la etapa de latencia se presentó en el mismo tiempo (0-1 horas) a ambas temperaturas pero la fase exponencial a 30 °C (1-12 horas) duró el doble que a 37 °C (1-6 horas). Al comparar las tres temperaturas empleadas, se observó que a la mayor temperatura (40 °C) se presentó una mayor velocidad específica de crecimiento en ambas cepas. Van den Berghe *et al.* (2006) reportaron el crecimiento de *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 en medio MRS suplementado con leche, en el cual se evaluó el efecto de diferentes temperaturas (20, 25, 30, 37, 42 y 45 °C) en el crecimiento y producción de bacteriocina y se reportó una velocidad de crecimiento máxima (de aproximadamente 2) en un rango de 25 a 37 °C, mientras que el intervalo de temperatura para la producción de bacteriocina fue de 20 a 25 °C, observando menor producción a mayores temperaturas (30-45 °C). La actividad antimicrobiana de *S. lutetiensis* A45212, se detectó a las 6 horas de iniciarse la fermentación a las dos temperaturas ensayadas (tabla 7). Se ha reportado que la producción de bacteriocinas por bacterias lácticas, puede ocurrir tanto durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano como en la estacionaria (Daschl *et al.*, 1990; Piard *et al.*, 1992). La producción de bacteriocinas en la fase inicial del crecimiento bacteriano podría favorecer el predominio de la cepa productora (Ahn y Stiles, 1990). La detección de actividad antimicrobiana desde las primeras horas del crecimiento indica que no es un metabolito secundario; la concentración de proteína se observa un ligero aumentó con el tiempo (tabla 8). La



disminución de esta actividad durante la fase estacionaria (tabla 7) podría deberse a la acción de enzimas proteolíticas endo o exocelulares, a que la sustancia antimicrobiana se descompone en otros metabolitos o su inestabilidad ante el aumento de la acidez del medio de crecimiento (Bhunia, 1991); por esto mismo para el ensayo de actividad antimicrobiana por acción de la proteína, se ocupó agar amortiguado y evitar con ello la acción de los ácidos orgánicos producidos por la cepa (Tavera, 2010).

### **Evaluación del efecto de pH inicial del medio de fermentación para la producción de compuestos antimicrobianos.**

Se evaluaron cuatro diferentes valores de pH inicial (5.5, 6.5, 7.5 y 8.0) para determinar su efecto en el crecimiento del microorganismo de estudio y en la producción del compuesto con actividad antimicrobiana.

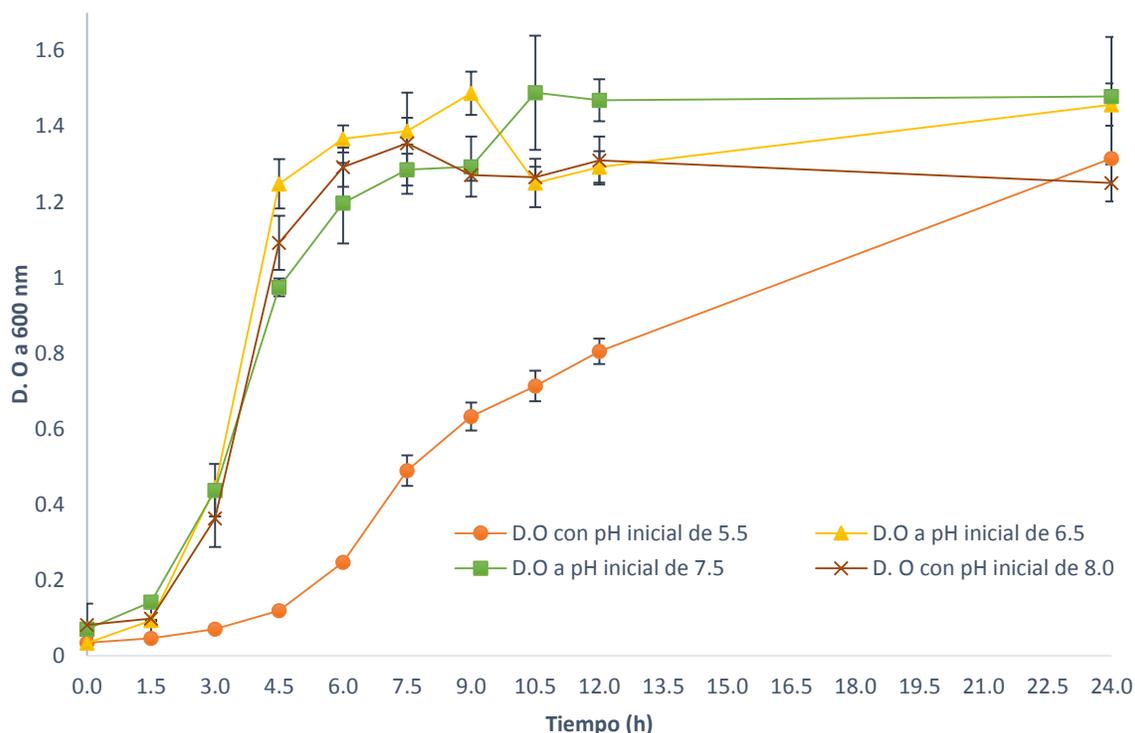


Figura 9. Efecto de pH inicial sobre la densidad óptica de *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS a 30 °C.

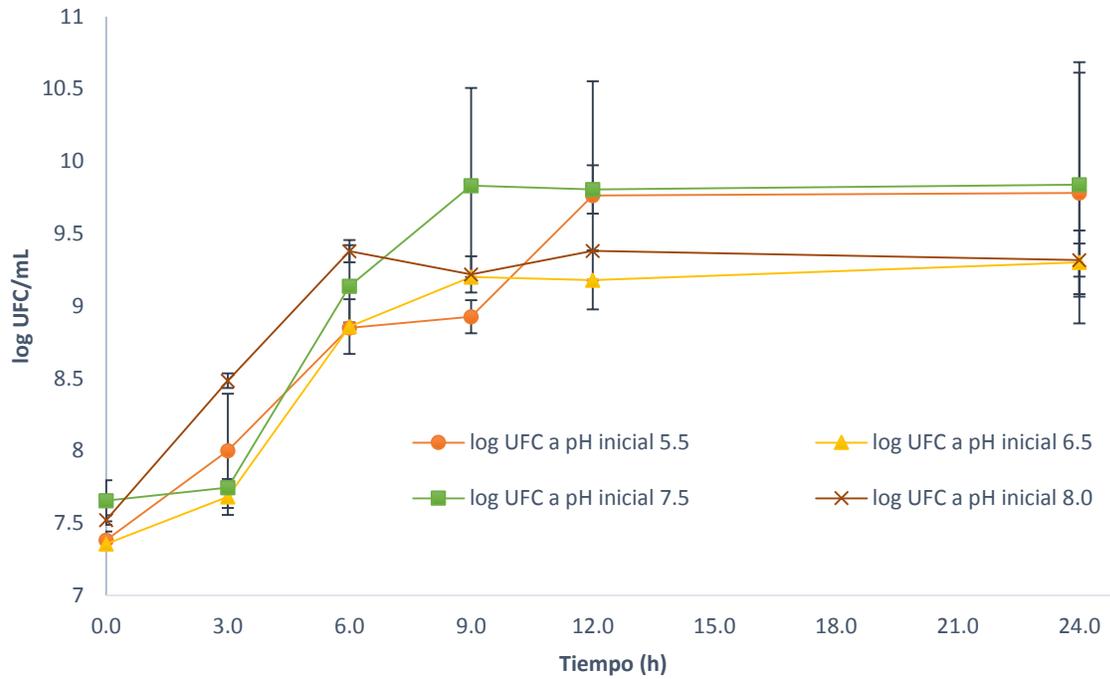


Figura 10. Efecto del pH inicial sobre la cuenta viable de *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS a 30 °C.

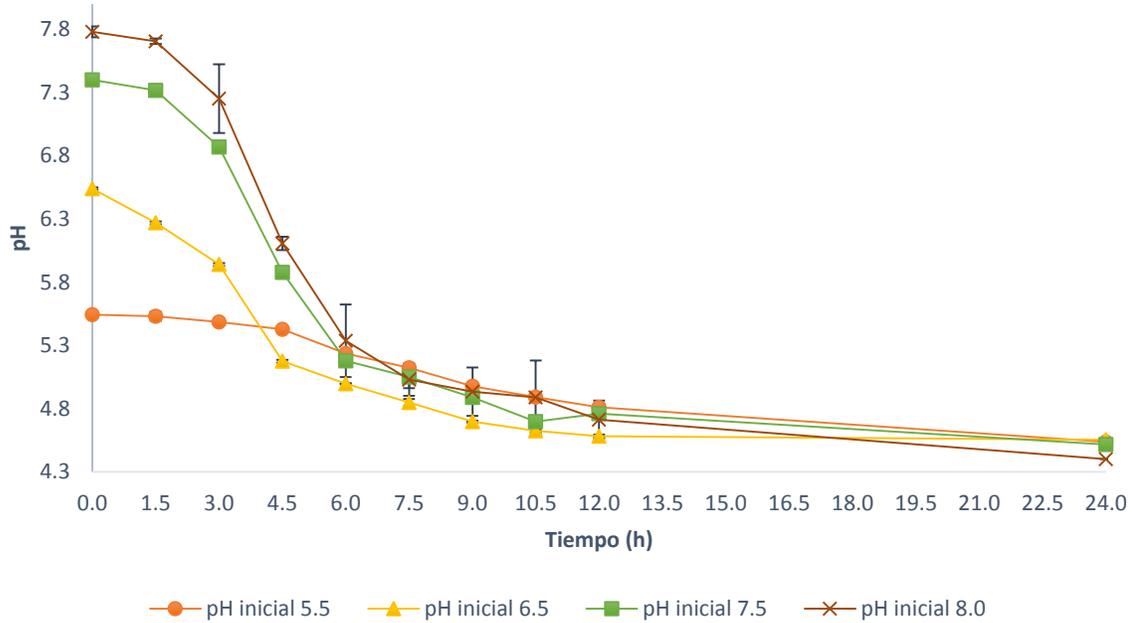


Figura 11. Valores de pH durante el crecimiento de *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS a 30 °C.



Tabla 9. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 contra *L. monocytogenes* en medio BHI tamponado.

Tiempo (h)	mm de halos							
	pH 5.5	Desviación estándar	pH 6.5	Desviación estándar	pH 7.5	Desviación estándar	pH 8	Desviación estándar
0	16	0	19	0.95742711	19	0	17	0
3	19	1.5	21.25	0.5	21	0	21	0.57
6	20	0.81	<b>22</b>	0	24.5	0.57	<b>23</b>	0
9	20	0	21.75	0.5	<b>25.25</b>	0.5	23	0
12	<b>21.75</b>	0.5	21	0	24.75	0.95	22	0
24	21	0.5	20	0	23.25	0.5	21.75	0.5

Tabla 10. Concentración de proteína total de sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 a diferentes valores de pH iniciales de fermentación.

Tiempo (h)	[µg de proteína total/mL de muestra]							
	pH 5.5	Desviación estándar	pH 6.5	Desviación estándar	pH 7.5	Desviación estándar	pH 8	Desviación estándar
0	167.25	8.53	175.92	1.06	209.32	7.20	208.57	4.53
3	168.00	3.20	171.21	7.20	205.55	7.20	207.62	9.07
6	160.83	34.15	<b>178.00</b>	8.80	212.91	19.74	<b>213.85</b>	33.35
9	165.92	10.40	168.38	6.40	211.21	10.94	204.04	4.002
12	153.28	17.61	155.74	0.80	<b>222.72</b>	0.53	171.96	41.89
24	158.94	5.87	170.45	1.86	211.21	24.28	181.58	3.20

Los resultados muestran el efecto que tiene el pH sobre el crecimiento de *S. lutetiensis* A45212 como se ve en el figura 9, donde se observa que el aumento de densidad óptica fue mayor a valores de pH cercanos a la neutralidad o ligeramente alcalinos, mientras que la densidad óptica a pH inicial de 5.5 fue menor y se observó un mayor tiempo de latencia. Mientras que en figura 9 se observa que la fase exponencial se extiende por tres horas más a pH 7.5 que a los demás valores de pH. La concentración de microorganismos fue mayor a pH inicial de 8.0 en las primeras 6 horas de crecimiento aunque a partir de las 9 horas dicha concentración ya no aumentó y así se mantuvo hasta las 24 h. De acuerdo con las figuras 9 y 10 el mejor crecimiento de la cepa se dio con



pH inicial de 7.5 a pesar de un menor crecimiento observado en las 3 primeras horas.

En la figura 11 se observan diferencias en los valores de descenso de pH en las cuatro condiciones aunque el valor de pH a las 24 horas fue similar (4.5); dicha reducción en los valores de pH coincidió con el aumento en la densidad óptica y la concentración de bacterias mostrados en las figuras 9 y 10.

López (2005) trabajó con dos cepas del género de *Streptococcus* aislados del pozol en las cuales determinó el efecto del pH inicial (4.5, 6.5 y 8.5) en el medio MRS-almidón. Para las dos cepas evaluadas, *S. bovis* A12202 y *S. macedonicus* A45201, la influencia de pH inicial tuvo diferentes resultados, ya que *S. bovis* A12202 mostró mayor crecimiento a pH de 8.5 (más alcalinos), la fase de latencia fue más corta y tuvo una velocidad de crecimiento específica mayor, en cambio *S. macedonicus* A45201 creció con mayor facilidad a pH de 6.5 ya que la fase exponencial se alcanzó en una hora, mientras que en el medio con pH inicial de 8.5 la fase exponencial se alcanzó después de 5 horas. En los medios de cultivo con valores de pH inicial ácido (4.5) las dos bacterias no crecieron ni se observaron variaciones en los valores de pH, sólo con *S. macedonicus* A45201 se tuvo un aumento de turbidez del medio después de 26 horas de incubación.



**Evaluación de crecimiento en las mejores condiciones (temperatura y pH inicial del medio de cultivo) de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MRS.**

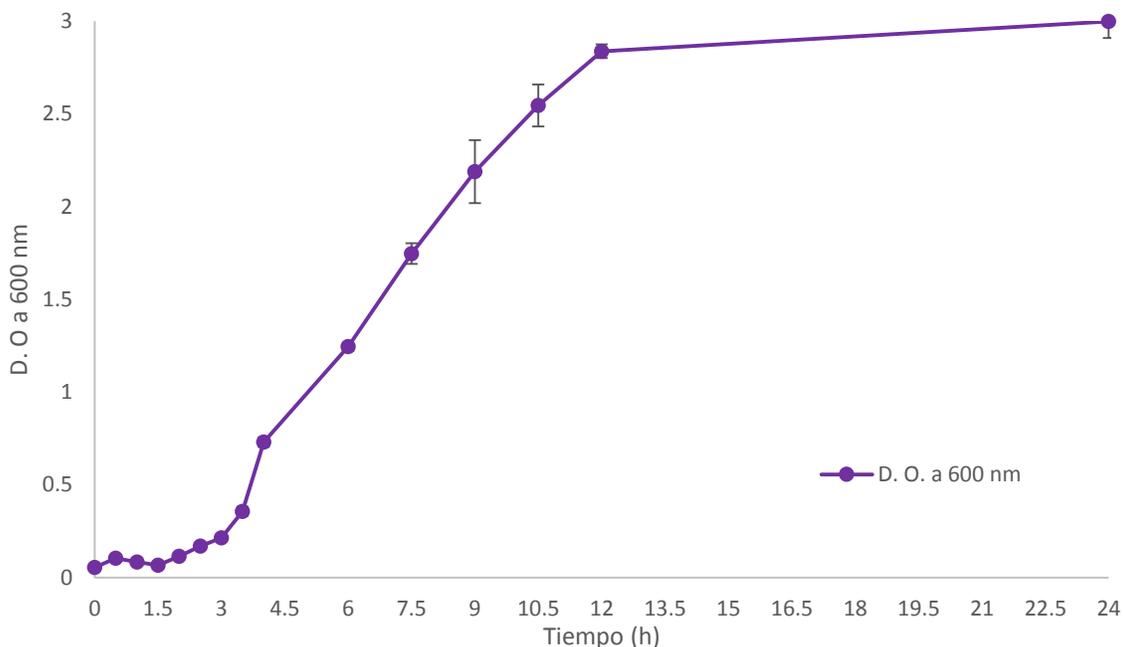


Figura 12. Densidad óptica a 600 nm durante la fermentación en las mejores condiciones de crecimiento (37 °C con pH inicial de 7.5) de *S. lutetiensis* A45212 para la producción de una proteína con actividad antimicrobiana en medio MRS.

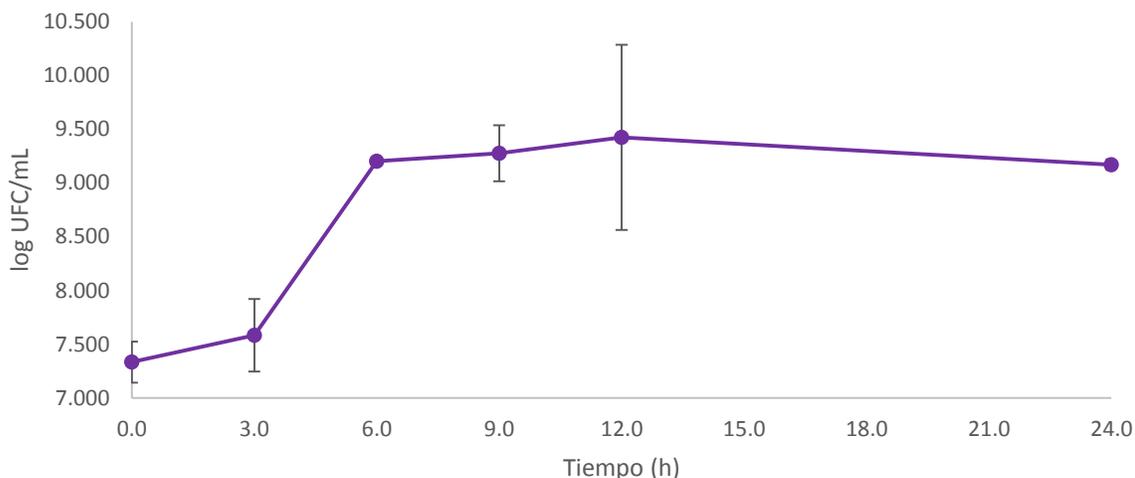


Figura 13. Cuenta en placa de *S. lutetiensis* A45212 en medio MRS durante la fermentación a 37 °C y pH inicial 7.5 para la producción de una proteína con actividad antimicrobiana.

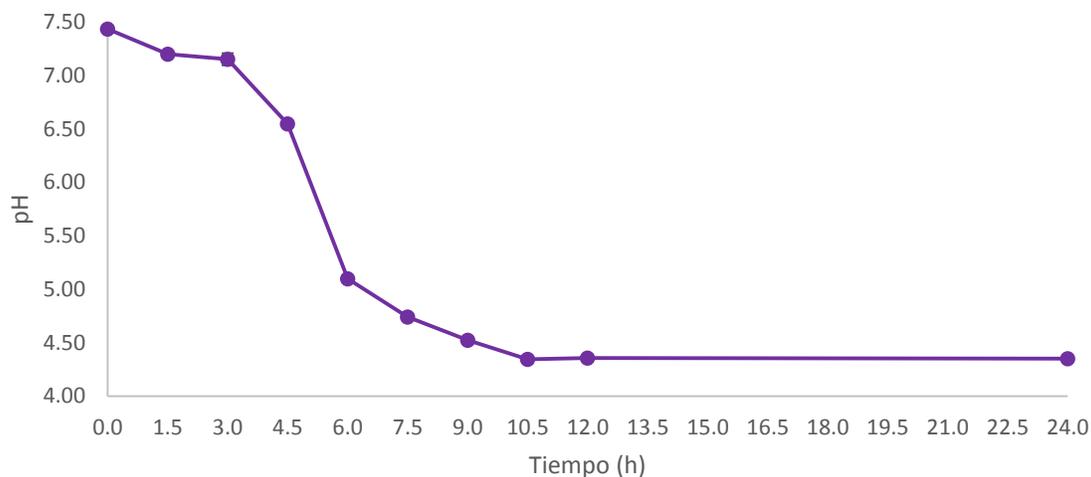


Figura 14. Valores de pH durante la fermentación en las mejores condiciones de crecimiento (37 °C y pH inicial de 7.5) de *S. lutetiensis* A45212 para la producción de una proteína con actividad antimicrobiana en el medio MRS.

Tabla 11. Actividad antimicrobiana de sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 en las mejores condiciones (37 °C y pH inicial de 7.5) contra *L. monocytogenes* (prueba de difusión en agar).

Tiempo (h)	mm de halos	Desviación estándar
0	17	0
3	20.5	0.57
6	<b>28.25</b>	0.5
9	25.25	0.95
12	24	0
24	23.25	0.95

Tabla 12. Concentración de proteína total de sobrenadantes de *S. lutetiensis* A45212 a 37 °C y pH inicial de 7.5.

Tiempo (h)	[µg de proteína total/mL de muestra]	Desviación Estándar
	37 °C/ pH inicial 7.5	
0	165.54	10.94
3	<b>232.52</b>	6.93
6	212.33	55.76
9	224.79	28.55
12	221.58	19.21
24	197.43	2.66

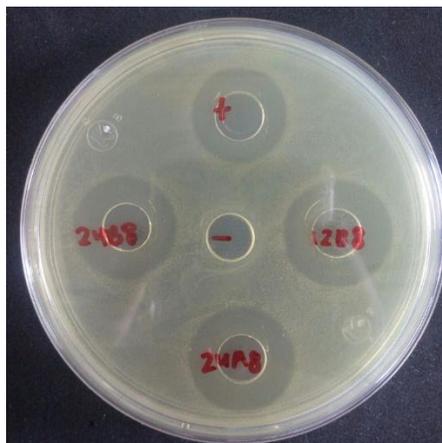


Figura 15. Prueba de difusión en agar. Ejemplo de inhibición de *L. monocytogenes* por sobrenadante sin tratar de *S. lutetiensis* A45212, medio BHI tamponado.

En el medio MRS con pH inicial de 7.5 y temperatura de incubación de 37 °C, se alcanzaron valores de densidad óptica a 600 nm semejantes a los descritas previamente para la fermentación en el medio MRS a 37 °C (sin modificar el pH del medio), la etapa de latencia se observó durante la primera hora, luego un aumento en la densidad óptica e inicio de la etapa exponencial a partir de las dos hasta las 12 horas (figura 12). Para la etapa de crecimiento exponencial se extendió una hora más ya que la etapa de latencia solo duro una hora que la fermentación a 37 °C y pH 6.5; alcanzando una valor máximo de densidad óptica de 2.99 a las 24 horas. Durante el monitoreo de cuenta en placa se observó la misma tendencia de las otras fermentaciones solo que el valor del log de UFC se redujo a las 24 horas (figura 13) lo que podría relacionarse con el valor de pH alcanzado en este tiempo el cual fue de 4.35 (figura 14) que fue el valor más bajo que se obtuvo de las fermentaciones realizadas. Este valor de pH podría haber causado una reducción en la cantidad de bacterias, (figura 13), ya que se ha reportado que el género *Streptococcus* es más susceptible a valores bajos de pH que otros géneros de BAL, como *Lactobacillus* (Cueto-Vigil *et al.*, 2010).



En la prueba de actividad antimicrobiana, se observaron halos de inhibición de 28.25 mm de diámetro a las 6 horas así como 212 µg/mL de proteína total en el mismo lapso de tiempo; lo que puede sugerir que la producción del compuesto proteínico con acción antimicrobiana está directamente relacionada con el crecimiento de la bacteria y que las dos variantes de crecimiento (temperatura y pH inicial del medio) crearon mejores condiciones para la producción de la proteína con actividad antimicrobiana.

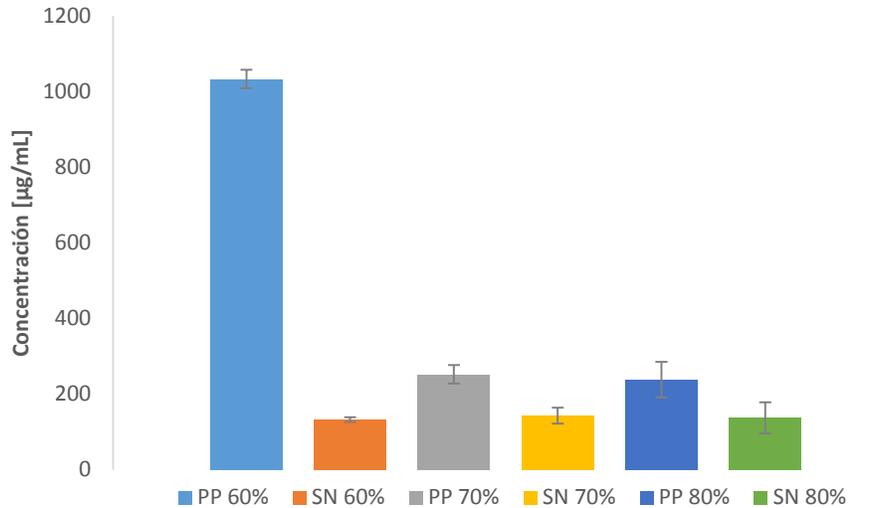
### **Precipitación con sulfato de amonio y diálisis de proteína con actividad antimicrobiana.**

Se utilizó un cultivo de 100 mL con *Streptococcus lutetiensis* A45212 incubado a 37 °C por 6 horas en medio MRS con pH inicial de aproximadamente 7.5. Se evaluaron tres concentraciones de saturación de sulfato de amonio las cuales fueron 60 %, 70 % y 80 %; y enseguida se dializaron los precipitados de proteína.

Tabla 13. Actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes* de sobrenadantes tratados con sulfato de amonio de *S. lutetiensis* A45212 (método de difusión en agar).

Fracción	mm de halos
PP 60%	30.00
SN 60%	17.67
PP 70%	25.67
SN 70%	14.00
PP 80%	24.50
SN 80%	12.50
PD 60%	27.00
PD 70%	23.17
PD 80%	21.67
BD 3H	0
BD 6H	0
BD 9H	0
BD 20 H	0
BD 24 H	0

PP=Proteína precipitada SN=Sobrenadante PD=Proteína dializada BD= buffer de diálisis



PP=Proteína precipitada SN=Sobrenadante

Figura 16. Concentración de proteínas totales en fracciones obtenidas por precipitación con sulfato de amonio.

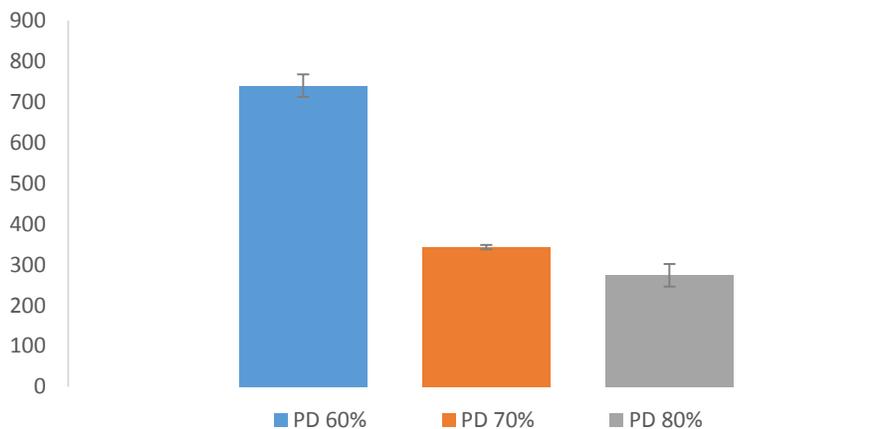


Figura 17. Concentración de proteínas totales en fracciones obtenidas dializadas después de precipitar con sulfato de amonio.

Mediante la adición de sulfato de amonio se logró separar tres fracciones de proteínas del medio de crecimiento; por regla general mientras más grande es el peso molecular de la proteína, se requiere menos sal para su precipitación (Tejeda *et al.*, 1995). En la figura 16 se observa que precipitó más proteína en la primera fracción de saturación de 60%, donde probablemente están las proteínas más grandes, como pueden ser las del medio de cultivo, proteínas extracelulares o enzimas liberadas al



medio. Siendo esta fracción la que cuenta con mayor actividad antimicrobiana (tabla 13). Dado que las cantidades residuales de sulfato de amonio pueden interferir con otras mediciones y métodos de purificación, tienen que ser removidos posteriormente (Prado-Barragán *et al.*, 1999; Nelson & Cox, 2008). Para eliminarlo se realizó una diálisis, aunque disminuyó ligeramente la actividad antimicrobiana (tabla 13) y la concentración de proteína (figura 17). Las fracciones siguientes también tuvieron actividad antimicrobiana, aunque menor a la observada en la fracción de 60%, es posible que más de una proteína este inhibiendo a *L. monocytogenes* ya que al tener un mayor porcentaje de saturación de sal se trataba de proteínas de menor tamaño.

Grajales (1999) utilizó una precipitación fraccionada, para lograr que la bacteriocina se precipitará entre un 60 y 80% de saturación y obtuvo como resultado una mayor actividad antimicrobiana con un 80% no obstante, se utilizó un porcentaje de saturación del 60% debido a que la actividad de la bacteriocina, reportada como unidades arbitrarias por mL, aumentaba menos de 2% en la precipitación al 80%, lo cual significaba un gasto innecesario de reactivos. Así mismo, Minor (2004) utilizó la precipitación fraccionada para la purificación parcial de un compuesto de origen proteínico con actividad antimicrobiana, encontrando que la mayor actividad de bacteriocina se dio con una concentración de sulfato de amonio de 60 y 80% una mayor actividad de bacteriocina eligiendo la fracción de 60% de saturación para los experimentos posteriores en el estudio de la bacteriocina para evitar uso innecesario de reactivo.

#### **Perfil proteico y zimograma.**

Se realizaron geles SDS-PAGE (16.5% T) en condiciones desnaturizantes para observar el perfil de proteínas presentes en las fracciones de proteína dializada (60, 70 y 80%), así también se elaboraron dos zimogramas uno con *Listeria innocua* y el segundo con

*Micrococcus lysodeikticus* ATCC 4698 para asociar las bandas de proteína observadas en los geles con las bandas de actividad antimicrobiana.

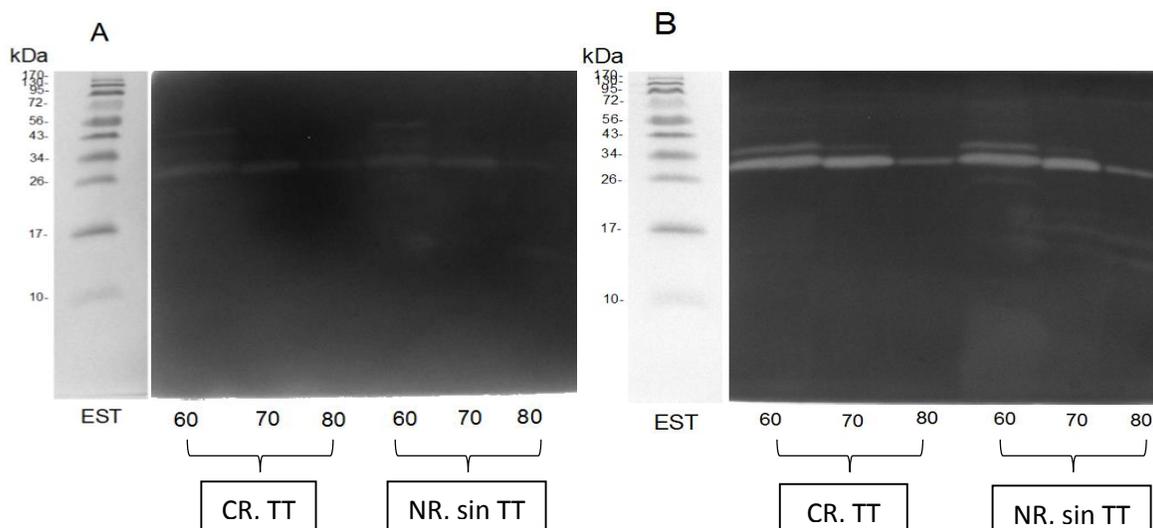


Figura 18. Detección de la actividad antimicrobiana (16.5% T, 2.6% C) en (A) *Micrococcus lysodeikticus* y en (B) *Listeria innocua*. Muestras bajo condiciones reductoras a 85 °C, 10 min (CR, TT) y no reductoras sin tratamiento térmico (NR, sin TT) correspondientes a la fracción precipitada al 60 % de saturación con sulfato de amonio y dializada (60); fracción precipitada al 70 % de saturación con sulfato de amonio y dializada (70); fracción precipitada al 80% de saturación con sulfato de amonio y dializada (80); Estándares preteñidos (EST) (#SM0671, Fermentas). Aproximadamente 30  $\mu$ L muestra/pozo. Incubación en buffer Tris-HCl (pH 7.0), 24 h a 30 °C. Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad).

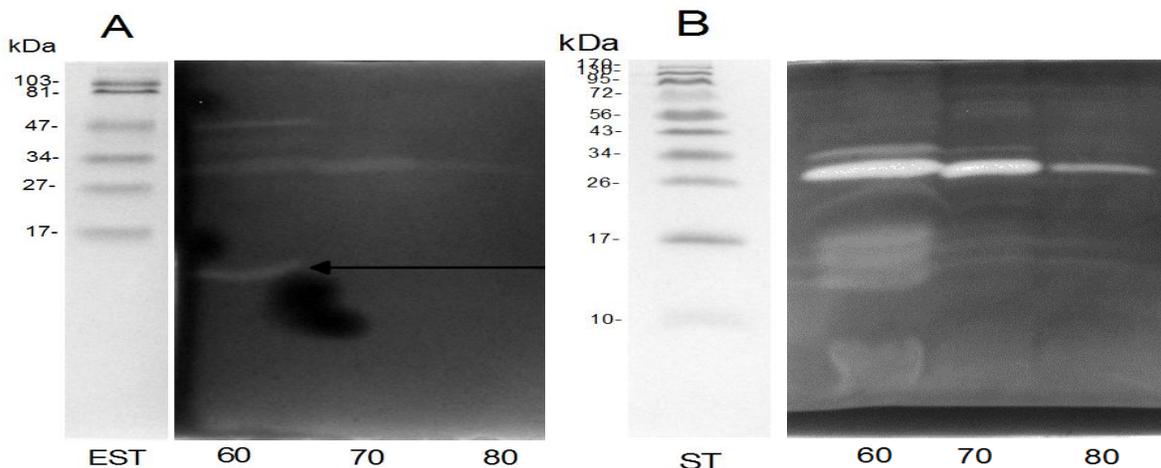


Figura 19. Detección de la actividad PGH (16.5% T, 2.6% C) en (A) *Micrococcus lysodeikticus* y en (B) *Listeria innocua*. Muestras -sin tratamiento térmico- correspondientes a la fracción precipitada al 60 % de saturación con sulfato de amonio y dializada (60); fracción precipitada al 70 % de saturación con sulfato de amonio y dializada (70); fracción precipitada al 80% de saturación con sulfato de amonio y

dializada (80). Estándares preteñidos de bajo peso molecular (EST) (Bio-Rad) y estándares preteñidos (ST) (Fermentas). Aproximadamente 30  $\mu$ L muestra/pozo. Incubación en buffer Tris-HCl (pH 7.0), 96 h a 30 °C. Gel Doc™ XR+ Imaging System (Bio-Rad).

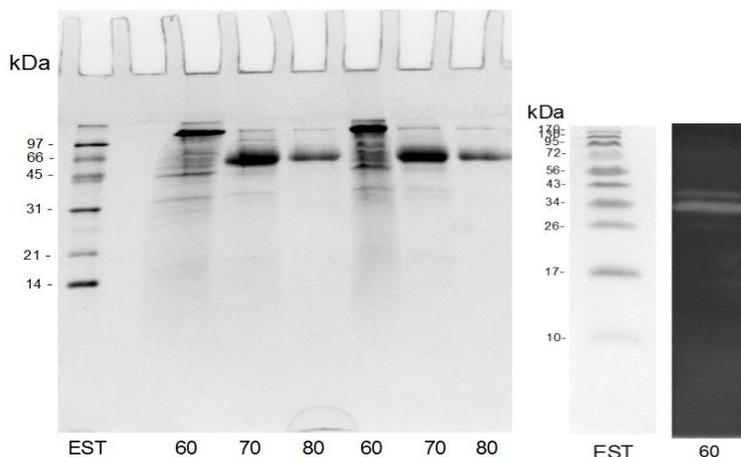


Figura 20. Perfil electroforético (16.5% T, 2.6% C). Muestras bajo condiciones reductoras a 85 °C, 10 min (CR, TT) y no reductoras sin tratamiento térmico (NR, sin TT) como en la figura 18A.

En la figura 18 se muestran los geles con los dos microorganismos sensibles. Se observan las bandas de inhibición entre los 26 y los 43 kDa que tienen actividad lítica en contra de los microorganismos indicadores; se muestra el comportamiento de las proteínas con dos distintos tratamientos, CR, condiciones reductoras, donde la proteína se sometió a un tratamiento previo con  $\beta$ -mercaptoetanol antes de ser depositada en el gel y TT, tratamiento térmico, el cual consistió en someter las fracciones con proteína a una temperatura de 96 °C. Tanto en la figura 18A como en la figura 18B se observan resultados muy similares respecto a la inhibición de los microorganismos, tanto de las proteínas con y sin tratamiento térmico, lo que nos indica que las proteínas de interés son termorresistentes, tal como previamente lo reportó Maldonado (2016). Es posible que las proteínas asociadas con la actividad antimicrobiana posean una estructura que tiene pocos puentes disulfuro lo que le da resistencia en condiciones reductoras (Salazar *et al.*, 2010, Cotter *et al.*, 2005). También se observó que disminuye la actividad antimicrobiana al



avanzar en los pasos de semipurificación, lo que puede deberse al congelamiento y descongelamiento de las fracciones o que en la fracción de 60% de saturación estén en mayor cantidad las proteínas con actividad antimicrobiana tanto de mayor como de menor peso molecular y en las demás fracciones (70 y 80%) se tengan las proteínas de menor peso y no exista un efecto sinérgico entre todas las proteínas por no estar todas presentes. En la figura 19B donde el microorganismo sensible es *Listeria innocua* se observó una mayor inhibición.

La producción de bacteriocinas puede contribuir al predominio de cepas BAL durante la competencia por nutrientes escasos con otras cepas residentes (Deegan *et al.*, 2006). Por lo tanto la presencia de proteínas y péptidos con actividad antimicrobiana es una ventaja selectiva potencial para las BAL. En ese caso, la producción de más de una proteína con actividad antimicrobiana podría darle ventajas a la cepa productora, respecto a otras cepas de BAL presentes durante la fermentación del pozol.

Se observó que dentro de las proteínas semipurificadas de *S. lutetiensis* A45212 había 2 bandas con actividad lítica contra *Micrococcus lysodeikticus* de 49.24 y 31.64 kDa aproximadamente (figuras 18A y 19A). Y dos bandas bien definidas de actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* de 41.17 y 33.41 kDa, así como otras tres bandas con menor actividad de 18.71, 15.54 y 12.32 kDa aproximadamente (figura 19B y 20). Por su carácter proteínico, las bandas descritas podrían ser consideradas como bacteriocinas, sin embargo, las bacteriocinas producidas por el género *Streptococcus* y descritas hasta el momento, poseen bajo peso molecular, tales como *S. salivarius* con salivaricina A de 2.3 kDa (Ross, 1993; Tagg, 2004 y Wescombe 2006), y salivaricina B con un peso de 2.7 kDa (Tagg, 2004), al igual que la macedocina de *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198 de 2.7 kDa (Georgalaki, 2002); la bovicina HJ503.4 de *S. bovis* con 3.4 kDa (Xiao, 2004). También se han



reportado otras bacteriocinas más grandes, producidas por bacterias del género *Streptococcus*, como la bovicina 225 de 5.9 kDa proveniente de *S. bovis* (Whitford, 2001). De acuerdo con los resultados descritos, las proteínas separadas tienen un peso mayor a 10 KDa, por lo que no se incluirían en las bacteriocinas clase II, a pesar de que en esta clasificación se incluyen péptidos termoestables y la proteína en estudio siguió conservando su actividad después de un tratamiento térmico de 105 °C. Se podrían tratar de peptidoglucano hidrolasas u otras enzimas extracelulares de mayor peso molecular que degrade la membrana bacteriana como las proteínas identificadas por Reyes (2015), P54 (56.4 kDa), *N*-acetilmuramoyl-L-alanina amidasa (70.4 kDa) y P54 (57,7 kDa) producidas por *Enterococcus faecalis*, las cuales mostraron actividad antimicrobiana y se sabe que están asociadas a la hidrólisis de la pared celular de *Listeria innocua* y *Staphylococcus aureus*; Valenzuela (2012) caracterizó dos proteínas con actividad PGH producidas por *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 de 110 y 99 kDa las cuales presentaron actividad muraidasa y endopeptidasa y Serrano (2013) identificó dos proteínas con un peso de 80 y 86 kDa, las cuales siguieron presentando actividad antimicrobiana (*N*-acetilglucosaminidasa) después de un tratamiento de 70 °C. Las proteínas con actividad antimicrobiana presentan un amplio rango de pesos moleculares, por lo que se tendría que realizar una identificación de proteínas por LC-MS/MS (cromatografía líquida acoplada a espectrofotómetros de masas capaces de producir espectros en tándem), el cual permite identificar proteínas a partir del espectro de masas de su huella peptídica para analizar las secuencias de los péptidos mediante el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool National Center of Biotechnology Information) para encontrar regiones de similitud con secuencias de otras proteínas reportadas en la base de datos.



## Conclusiones

Se obtuvo un mejor crecimiento de *Streptococcus lutetiensis* A45212 en el medio MRS con:

- ✓ pH inicial de 7.5
- ✓ Temperatura de incubación de 37 °C.

Las mejores condiciones para la producción de las proteínas con actividad antimicrobiana fueron:

- ✓ En medio MRS con pH ajustado de 7.5 incubando a 37 °C por 6 horas.

Las proteínas con actividad antimicrobiana contra *Micrococcus lysodeikticus* tiene un peso molecular de 49.24 y 31.64 kDa aproximadamente.

Las proteínas con actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* tienen un peso molecular aproximado de 41.17 y 33.41 kDa.



## Perspectivas

Realizar precipitaciones con sulfato de amonio con otros porcentajes de saturación para determinar la fracción de mayor concentración de proteínas con actividad antimicrobiana o probar otros tipos de precipitación de proteínas como adición de solventes o polímeros orgánicos, por alteraciones de pH o temperatura o por la adición de ligandos u otra técnica para la semipurificación y concentración como la ultrafiltración. Para la purificación de las proteínas tradicionalmente se ocupa el fraccionamiento cromatográfico como intercambio iónico, de interacción hidrofóbica, de fase reversa y de afinidad, todo dependerá del grado de pureza y cantidad de proteína que se desea lograr y claro del presupuesto para determinar la mejor opción de purificación. Posteriormente determinar la concentración mínima inhibitoria de la(s) proteína(s) de interés contra *L. monocytogenes* y los parámetros cinéticos de la enzima si está lo fuera; para la actividad antimicrobiana óptima.



## Anexos

### ANEXO 1.

Preparación de la muestra para los geles de perfil proteico.

Se descongelaron las muestras y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y 100  $\mu\text{L}$  de una mezcla de buffer de muestra 2X con  $\beta$ -mercaptoetanol (475  $\mu\text{L}$  buffer 2X+25  $\mu\text{L}$ ) para condiciones reductoras y para el zimograma fueron 100  $\mu\text{L}$  de muestra y 100  $\mu\text{L}$  de buffer de muestra 2X. Las muestras en condiciones reductoras se llevaron a calentamiento a 85  $^{\circ}\text{C}$ / 300 rpm/ 10 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se pasaron a una cama de hielo; una vez fríos se agitaron y centrifugaron. Las muestras se guardaron a -20  $^{\circ}\text{C}$ .

Tabla 14: Composición de Buffer 2X:

Componentes	Volumen (mL)
Buffer 4XC	2.5
SDS al 10%	4.0
Agua desionizada	1.25
Glicerol	2.0
Azul de bromofenol al 0.05%	0.25

Buffer 4XC: 3.0 g Tris-base, 30 mL de agua desionizada, ajustar a pH 6.8 y aforar a 50 mL.



## ANEXO 2.

Formulación de geles.

Tabla 15. Formulación de gel concentrador (4% T, 2.6% C). (Para dos geles).

<b>Componente del gel concentrador</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>Agua desionizada desgasificada</b>	6.08
<b>Buffer 4X-C 0.5 M (pH 6.8)</b>	2.50
<b>Acrilamida</b>	1.30
<b>APS</b>	0.05
<b>TEMED</b>	0.01
<b>Volumen final</b>	10.0

Añadir en el orden indicado.

Tabla 16: Formulación del gel separador (16.5% T, 2.6% C). (Para dos geles).

<b>Componente del gel separador</b>	<b>Volumen (mL)</b>
<b>Agua desionizada desgasificada</b>	1.84
<b>Buffer 4X-C 0.5 M (pH 6.8)</b>	2.60
<b>Acrilamida</b>	5.50
<b>APS</b>	0.05
<b>TEMED</b>	0.01
<b>Volumen final</b>	10.0

Buffer de tanque 5X: 15.14 g de Tris-base, 72.065 g de glicina, 5 g de SDS y se disuelven en agua desionizada filtrada. Llevar a la marca de aforo de 1L (pH aproximado de 8.3).

### ANEXO 3. Formulación de zimogramas.

El gel concentrador tiene la misma formulación que los de perfil proteico.

Tabla 17: Formulación del gel separador para el zimograma con *Micrococcus lysodeikticus* (16.5% T, 2.6% C). (Para dos geles).

Componente del gel separador	Volumen (mL)
Agua desionizada desgasificada	1.85
Buffer 4X-C 0.5 M (pH 6.8)	2.60
Células (Sigma No. 4698)	0.5 g
Acrilamida	5.50
APS	0.05
TEMED	0.01
<b>Volumen final</b>	<b>10.0</b>

Tabla 18: Formulación del gel separador para el zimograma con *Listeria innocua 2* (16.5% T, 2.6% C). (Para dos geles).

Componente del gel separador	Volumen (mL)
Agua desionizada desgasificada	1.85
Buffer 4X-C 0.5 M (pH 6.8)	2.60
Células (cultivo fresco)	0.5
Acrilamida	5.50
APS	0.05
TEMED	0.01
<b>Volumen final</b>	<b>10.0</b>

Preparación de cultivo fresco de *Listeria innocua 2*.

1. Del cultivo activado al 0.05% crecer una alícuota de 0.5 mL del microorganismo en 50 mL de caldo BHI a 37 °C por 12 horas.
2. Centrifugar para eliminar el medio de cultivo a 10 000 rpm a 4 °C por 15 minutos.
3. Lavar las células con solución salina isotónica al 0.85% dos veces centrifugando en las condiciones ya descritas.
4. Agitar con 0.5 mL de agua ionizada desgasificada.



#### ANEXO 4.

Soluciones desteñidoras para los zimogramas.

Tabla 19: Composición de solución desteñidora 1.

Componente	Agua	Metanol	Ácido acético
Proporción	5	4	1
1L de solución	500 mL	400 mL	100 mL

Tabla 20: Composición de solución desteñidora 2.

Componente	Agua	Metanol	Ácido acético
Proporción	88	5	7
1L de solución	880 mL	50 mL	70 mL

#### ANEXO 5.

Ensayos de difusión en agar para la cepa *S. lutetiensis* A45212.

A continuación se muestran las fotografías de las placas de difusión en agar con los halos producidos por los sobrenadantes. En cada pozo está marcado la hora de fermentación en que se separó el sobrenadante, el control positivo (+) y el control negativo (-).

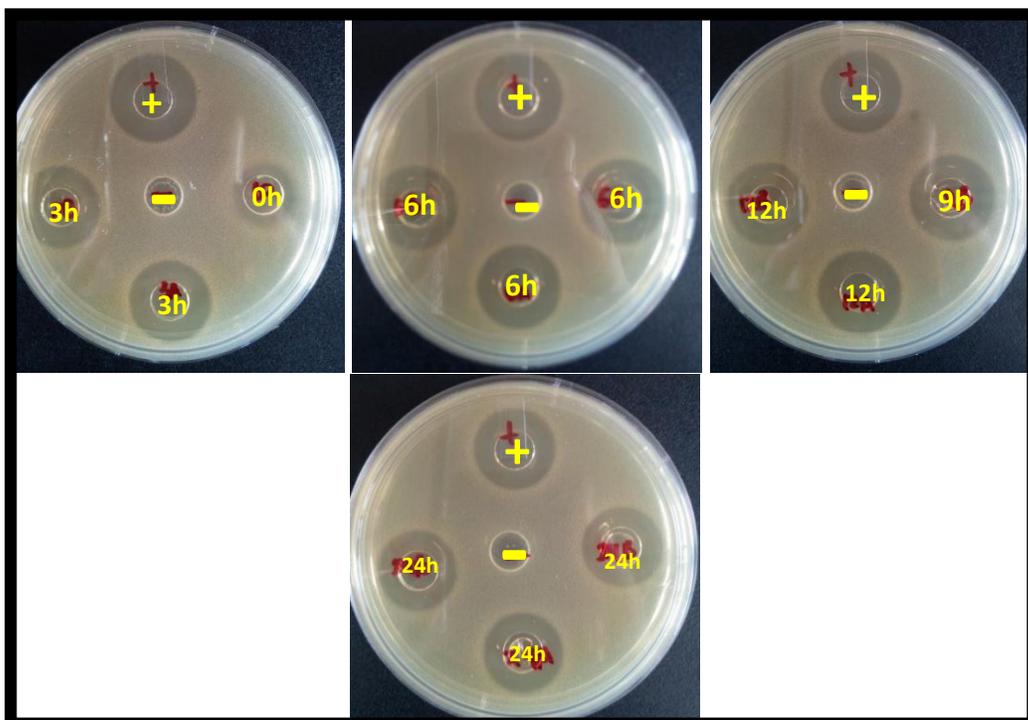


Figura 21. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 30 °C a pH inicial 6.5. Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

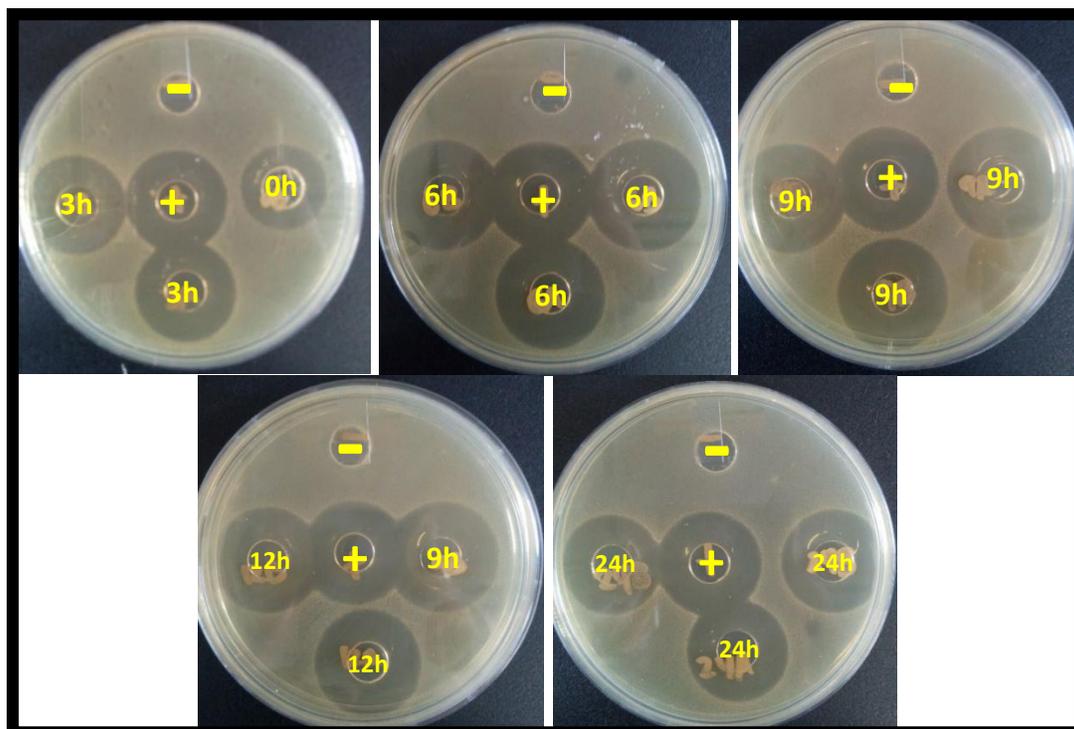


Figura 22. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 37 °C a pH inicial 6.5. Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

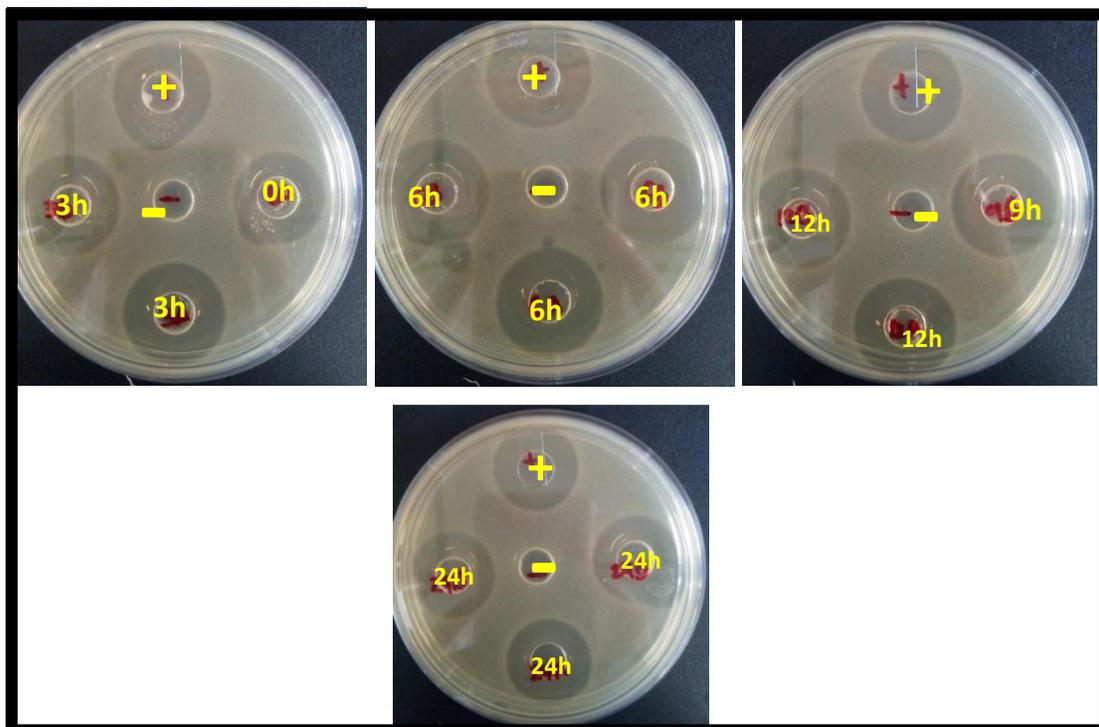


Figura 23. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 30 °C a pH inicial 7.5. Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

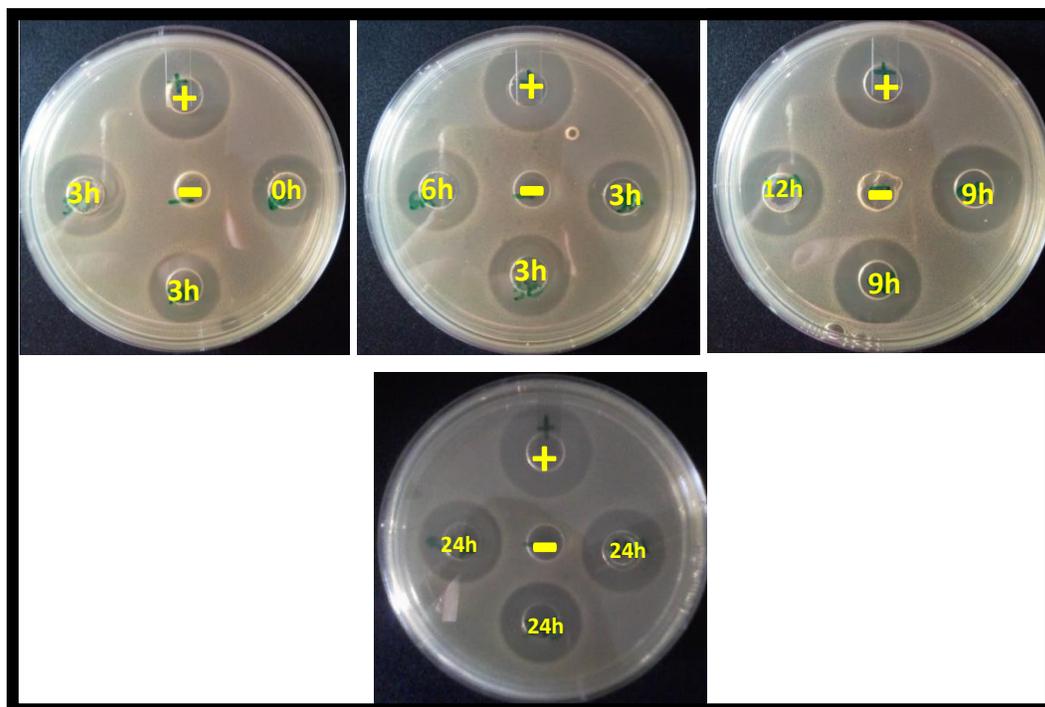


Figura 24. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 30 °C a pH inicial 5.5 Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

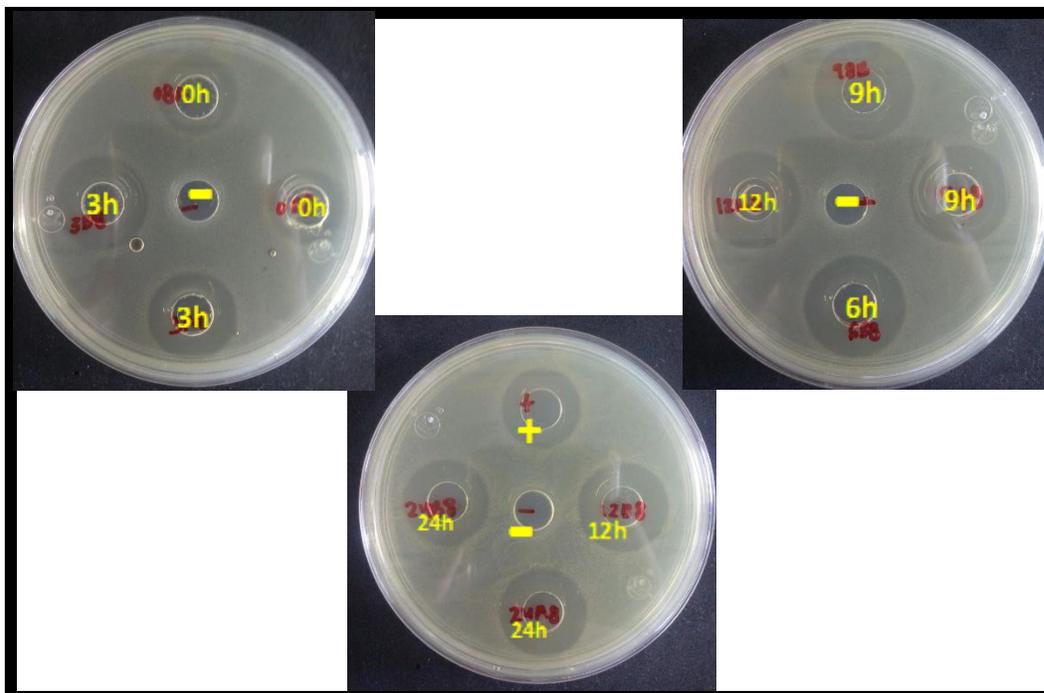


Figura 25. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 30 °C a pH inicial 8.0. Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

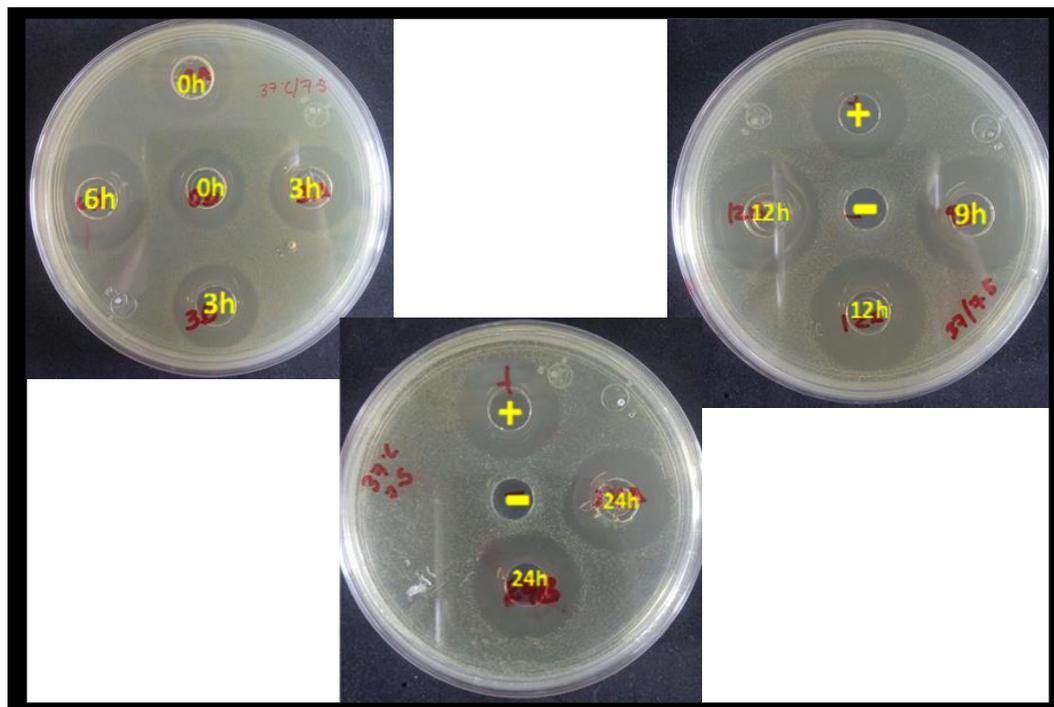


Figura 26. Halos de inhibición obtenidos con la técnica de difusión en agar, producidos por sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 a 37 °C a pH inicial 7.5 (condiciones óptimas). Bacteria indicadora: *Listeria monocytogenes*.

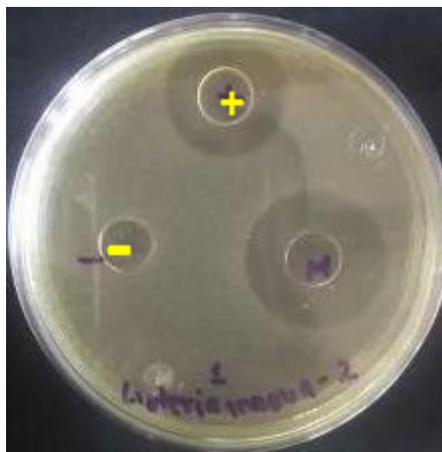


Figura 27. Prueba de inhibición con la técnica de difusión en agar por los sobrenadantes de cultivo de la fermentación de *S. lutetiensis* A45212 (37 °C con pH inicial 7.5 de medio MRS) frente a *Listeria innocua* 2 como microorganismo indicador.



## **Bibliografía.**

Aguilar Morales J., (2012), Conservación de alimentos, Estado de México, Red Tercer Milenio, pp. 287-306.

Ahn C., Stiles M. E., (1990), Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats, *AppI. Bacteriol.*, 302-310.

Ampe F., Ben N., Moizan C., Wachter C., Guyot J., (1999), Polyphasic Study of Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a fermentes Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods to investigate Traditional Fermentations, *AppI. Bacteriol* , 5464-5473.

Axelsson L, (1993), Clasificación de bacterias ácido lácticas y fisiología, Salminen, S y von Wright, Ed New York, Marcel Dekker.

Baranyi J., Roberts T., (1994), A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *International Journal of Food Microbiology*, 277-294.

Bello J., (2000), Ciencia bromatológica, Primera edición, Ediciones Díaz Santos, 388.

Ben Omar N., Ampe F., (2000), Microbioal community dynamics durind production oh Mexican fermented maize dough pozol, *AppI. Bacteriol*, 66, 3664-3673.

Bhunia A. K., Johnson M. C., Ray B. y Kalchayan N., (1991), Mode of action of pediocin Ach form *Pediococcus acidilacticí H* on sensitive bacterial strains, *AppI. Bacteriol.*, 70: 25-33.



Bradford M., (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal Biochem*, 72:248-254.

Buchanan R., Cygnarowicz M., (1990), A mathematical approach toward defining and calculating the duration oh the lag phase, *food microbiology*, 237-240.

Callewaert R., Holo H., Devreese B., Van Beeumen J., Nes I., De Vuyst L., (1999), Characterization and production of amylovorin L471, a bacteriocin purified from *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 by a novel three-step method, *Microbiology*, 2559–2568.

Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez, (2009), *Técnicas para el análisis Microbiológico de Alimentos*. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.

Casp A., Requena J., (2003), *Procesos de conservación de alimentos*, Mundi-Prensa, Madrid, 2003.

Chen H., Hoover., (2003), Bacteriocinas y su aplicación en alimentos, *Comprehensive Reviews in Food Science and food Safety*, 2:82-100.

Cotter PD., Hill C., Ross RP., (2005), Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nature Reviews Microbiology*, 3(10):777-788.

Daeschel M.A., McKenney M.C. y McDonald L.C., (1990), Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11, *Food Microbiology* 7:91-98.



De Vuyst L. y Vandamme, E.J., (1994), Bacteriocins of lactic acid bacteria, Microbiology, genetics and applications, Blackie Academic and Professional, 1ra. Edición, Holanda, 6-7.

De Vuyst L., Callewaert R., Crabbé K., (1996), Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions, Microbiology, 817-827.

Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C. y Janssens, D., (1994), Caractéristiques générales des bactéries lactiques. En Bactéries Lactiques. H. de Roissart y F.M. Luquet (eds.), Vol. I, Loriga. Uriage, La France, 25-116.

Desrosier W., Norman, (1981), Conservación de alimentos, CECSA, México.

Díaz- Ruiz Gloria, (2003), Fermentación del almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol (Tesis de Doctorado), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Díaz-Ruiz G., Guyot J., Ruiz-Teran F., 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 maize fermented food", *AppI. Bacteriol*, 69:4367-4374.

Eckert C., Lecerf M., Dubost L., Arthur M & Mesnage S., (2006), Functional analysis of AtIA, the major N-acetylglucosaminidase of *Enterococcus faecalis*, *J. Bacteriol*, 188: 8513-8513.



Eifert JD., Gennings C., Carter Jr., Duncan SE., and Hackney CR., (1996), Predictive Model with Improved Statistical Analysis of Interactive factors Affecting the growth of *Staphylococcus aureus* 196E, *Journal of food Protection*, 59:608-614.

Ennahar S., Sashihara T., Sonomoto K., Ishizaki A., (2000), Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity, *FEMS Microbiology Rev*, 24:85-106.

Fischetti V., (2010), Bacteriophage endolysins: a novel anti-infective to control Gram-positive pathogens, *Int J Med Microbiol*, 357-62.

Foulquié Moreno MR., Callewaert R., De Vuyst L., (2001), Isolation of bacteriocins through expanded bed adsorption using a hydrophobic interaction medium. *Bioseparation*, 45-50.

Foulquié Moreno MR., Callewaert R., Devreese B., Van Beeumen J., De Vuyst L., (2003), Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources, *Appl Microbiol*, 214-229.

Foulquié Moreno MR., Leisner JJ., Tee LK., Ley C., Radu S., Rusul G., Vancanneyt M., De Vuyst L., (2002), Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*, *Appl Microbiol*, 147-157.

Fuente Salcido NM., Barbosa Corona JE., (2010), Inocuidad y bioconservación en alimentos, *Acta universitaria*, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México, 43-52.



Georgalaki MD., Van den Berghe E., Kritikos D., Devreese B., Van Beeumen J., Kalantzopoulos G., De Vuyst L., Tsakalidou E., (2002), Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, *Appl Microbiol* 2002; 5891–5903.

Grajales E., (1999), Caracterización de la bacteriocina L5 producida por *Lactococcus lactis* 5, (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.

Hermoso J., García J., García P., (2007), Taking aim on bacterial pathogens: from phage therapy to enzybiotics, *Curr Opin Microbiol*, 461–72.

Hurst A., (1981), Nisin, *Adv. AppI. Microbiol.*, 27: 85-123.

ICMSF, (1983), *Ecología Microbiana de los Alimentos 1. Factores que afectan a la supervivencia de los Microorganismos en los Alimentos.* Editorial Acribia, Zaragoza España.

Jack R.W., Tagg J.R. y Ray B., (1995), Bacteriocinas de bacterias Gram positivas, *Microbiol. Rev.*, 59: 171-200.

Kang OJ., Laberge S., and Simard RE., (2003), Detection and localization of a peptidoglycan hydrolase in *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *J. Dairy Sci*, 86: 96-104.

Klaenhammer R, (1993), Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.



Klaenhammer T.R., (1988), Bacteriocins of lactic acid bacteria, *Biochimie* 70, 337-349.

Laemmli UK., (1970), Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, 227:680-685.

Layec S., Decaris B., Leblond-Bourget N., (2008), Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation, *Research in Microbiology*, 159:507-515.

Lejeune R, Callewaert R, Crabbé K, De Vuyst, (1998), Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation, *Appl Microbiol*, 159-168.

Leroy F., De Vuyst L., (1999), Temperature and pH conditions that prevail during the fermentation of sausages are optimal for the production of the antilisterial bacteriocin sakacin K, *Appl Microbiol*, 65:974-981.

Leroy F., De Vuyst L., (2000), Sakacins; in Naidu AS, *Natural Food Antimicrobial Systems*, Boca Raton, CRC Press LLC, 589-610.

Leroy F., De Vuyst L., (2001), Growth of the bacteriocin producing *Lactobacillus sakei* strain CTC 494 in MRS broth is strongly reduced due to nutrient exhaustion: a nutrient depletion model for the growth of lactic acid bacteria, *Appl Microbiol*, 10:4407-4413.

Leroy F., De Vuyst L., (2005), Simulation of the effect of sausage ingredients and technology on the functionality of the bacteriocin-producing *Lactobacillus sakei* CTC 494 strain. *Int J Food Microbiol*, 141-152.



Lianou A., Sofos JN., (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*, 2172-2198.

López Munive M., (2005), Efecto del pH y la temperatura del crecimiento de bacterias del genero *Streptococcus* aisladas del pozol (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.

Lortal S & Chapot-Chartier MP., (2005), Role, mechanisms and control of lactic acid bacteria lysis in cheese, *Int. Dairy J*, 15: 857-871.

Madigan M., Martinko J., Parker J., (1997), *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall International, Inc, 149-177.

Maidment C., Dyson A., Beard J., (2009), A study into measuring the antibacterial activity of lysozyme-containing foods, *Nut Food Sci*, 29-35.

Maldonado C., (2016), Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales, (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.

Martinez F., Yulán C., Villafañe R., Cardozo M., Vasek O., (2009), Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus Lactis* subsp. *Lactis* bv. *Diacety Lactis 166cVCOR*, *Comunicaciones científicas y Tecnológicas*, 020/07.



McMeekin TA., Olley J., Ross T., and Ratkowsky DA., (1993), Predictive Microbiology: Theory and Application, Research Studies Press, Taunton, UK, 340.

Méndez-Albores J., Arámbula-Villa G., Preciad-Ortiz R., Moreno E., (2004), Aflatoxins in pozol, a nixtamalized, maize-base food, International Journal of Food Microbiology.

Microbiology Procedure. 2007. Methods of determining microorganisms growth (en línea). Consultado el 29 de mayo de 2016. Disponible en: <http://www.microbiologyprocedure.com/growthofmicroorganisms/methods-of-determining-growth.htm>

Minior H., (2004), Caracterización bioquímica y espectro de inhibición microbiana de las bacteriocinas producidas por *Lactobacillus buchneri* y *Lactobacillus paracasei*, (Tesis de doctorado), Universidad Autónoma Metropolitana.

Moll GN., Roberts GK., Konings WN., Driessen AJM., (1996), Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation, *Antonie van Leeuwenhoek*, 69:185-191.

Monteville T.J. y Kaiser A.L., (1993), Proteínas antimicrobiales: clasificación, nomenclatura diversidad y relación entre bacteriocinas, En *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Hoover, D.G. y Steenson, L.R, Academic press, Inc. New york, 1-22.

Montville T., (2000), Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos, *Microbiología de los Alimentos fundamentos y fronteras*, Acribia, S. A. Zaragoza, 13-30.



Moreno MRF., Leisner JJ., Tee LK., Ley C., Radu S., Rusul G., Vancanneyt M. and De Vuyst L., (2002), Microbial analysis of Malaysian tempeh, and characterization of two bacteriocins produced by isolates of *Enterococcus faecium*., *J. Appl. Microbiol.*, 92: 147-157.

Mørtvedt CI., Nissen-Meyer J., Sletten K, Nes IF., (1991), Purification and amino acid-sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45, *Appl Microbiol*, 1829–1834.

Nakimbugwe D., Masschalck B., Deckers D., Callewaert L., Aertsen A., Michiels C., (2006), Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts, *FEMS Microbiol Lett* 41–60.

Nandakumar MP., Shen J., Raman B., Marten MR., (2003), Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis, *Journal of Proteome Research*, 2:89-93.

Nelson DL., Cox MM., (2008), Lehninger. Principles of Biochemistry, 5ª edición, W. H. Freeman and Company, Nueva York, NY., 85-91.

Nuraida L., Wachter MC., y Owens JD., (1995), Microbiology of pozol, mexican fermented maize dough. *Word Journal of Microbiology and Biotechnology* Vol. 11, 567-571.

Olvera M., Serrano C., Quirasco M., (2015), Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas, *BioTecnología*, núm. 1, Volumen 19, 25-41.



Orsi RH., den Bakker HC., Wiedmann M., (2011), *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int J Med Microbiol*; 79-96.

Parente E., Ricciardi A., (1999), Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Microbiol*, 628-638.

Piard, Muriana J. C., Desmazeaud M., Klaenharnmer T.R., (1992), Purification and partial characterization of Lactacin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *laclis* CNRZ 481, *Appl. Microbiol*, 279-284.

Por riesgo de *Listeria* retiran alimentos congelados en México, (20 de agosto de 2015), *Excelsior*, Recuperado en: <http://www.excelsior.com.mx/nacional/2016/05/20/1093882>

Posfay-Barbe KM., Wald ER., (2009), *Listeriosis*. *Semin Fetal Neonatal Med*; 228-233.

Prado-Barragán LA., Huerta-Ochoa S., Rodríguez-Serrano G & Saucedo-Castañeda G., (1999), *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología*. Colección Tópicos en Biotecnología. 1ª edición. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, DF, 33-87.

Prescott LM., Harley JP., and Klein DA., (1999), *Microbiología*, 4ta Edición, McGraw-Hill, Interamericana, 114-136.

Reyes J., (2015), *Identificación de la actividad antimicrobiana de cepas bacterianas del género Enterococcus*, (Tesis de maestría), Universidad Autónoma Metropolitana.



Richards-Granados H., (2017), Estudio de las actividades enzimáticas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos cárnicos madurados, (Tesis de Licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.

Ross KF., Ronson CW., and Tagg JR., (1993), Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene sala from *Streptococcus salivarius* 20P3, *Appl Microbiol*, 2014–2021.

Ruiz C., (2017), Enfermedades transmitidas por alimentos, (En línea). Consultado el 6 de septiembre de 2017. Disponible en: [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225246/3\\_Enfermedades\\_Transmitidas\\_por\\_Alimentos\\_-DGE.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225246/3_Enfermedades_Transmitidas_por_Alimentos_-DGE.pdf)

Sainz T., Wachter C., Espinoza J., Centurión D., Navarro A., Cravioto A., Eslava C., (2001), Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-Fermented food, *International Journal of Food Microbiology*.

Salazar L., Gavilanes M., Maya V., Ramos c., (2010), Compendio de bioquímica (en línea). Consultado el 26 de julio del 2017. Disponible en: <https://bioquimicafq4unam.files.wordpress.com/2011/08/tema-i-a-vii-pags-1a-39.pdf>

Salminen S., von Wright A., Ouwehand A., (2004), *Lactic acid bacteria. microbiological and Functional Aspects*, 3ª edición, Marcel Dekker Inc. Nueva York, 375-398.

Serrano C., (2013), Caracterización de peptidoglucano hidrolasas de bacterias ácido lácticas aisladas del queso cotija, (Tesis de maestría), Universidad Nacional Autónoma de México.



Stiles ME., (1996), Biopreservation by lactic acid bacteria, Antonie van Leeuwenhoek, 331-345.

Tagg J.R., Dajani A.S., y Wannamaker, L.W, (1976), Bacteriocinas de bacterias Gram positivas, Bacteriol. Rev., 40: 722-756.

Tagg JR., (2004), Prevention of streptococcal pharyngitis by anti-Streptococcus pyogenes bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) produced by Streptococcus salivarius, Indian J. Med. Res, 13-16.

Tavera F., (2010), Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para a inhibición de bacterias patógenas, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.

Tejeda M., Montesinos C., Guzmán Z., (1995), Precipitación. Bioseparaciones, 1ra Edición, Editorial UNISON, México.

Tichaczek PS., Meyer JN., Nes IF., Vogel RF., Hammes WP., (1992), Characterization of the bacteriocins curvacin A from Lactobacillus curvatus LTH1174 and sakacin P from L. sake LTH673, Appl Microbiol, 460-468.

Valenzuela A., (2012), Caracterización de las peptidoglucano hidrolasas de Pediococcus acidilactici ATCC 8042, (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México.

Van den Berghe E., Giorgos Skourtas, Effie Tsakalidou, Luc De Vuyst, (2006), Streptococcus macedonicus ACA-DC 198 produces the lantibiotic,



macedocin, at temperature and pH conditions that prevail during cheese manufacture, *International Journal of Food Microbiology*, 138 – 147.

Verluyten J., Leroy F. and De Vuyst L., (2004), Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolate *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Appl Environ Microbiol*, 5081–5088.

Vollmer W., Joris B., Charlier P & Foster S., (2008), Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases, *FEMS Microbiol. Rev*, 32(2): 259-86.  
Wacher C., (2014), La biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados, *Revista digital universitaria*, 15:8, 9-10.

Wescombe P. A., Upton M., Dierksen KP., Ragland NL., Sivabalan S., Wirawan RE., Inglis MA., Moore CJ., Walker GV., Chilcott CN., Jenkinson HF., and Tagg JR., (2006), Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva, *Appl. Microbiol*, 1459–1466.

Whitford M. F., McPherson MA., Forster RJ., and Teather RM., (2001), Identification of bacteriocin-like inhibitors from rumen *Streptococcus* spp. and isolation and characterization of bovicin 255, *Appl. Microbiol*, 569–574.

Xiao H., Chen X., Chen M., Tang S., Zhao X., and Huan L., (2004), Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50, *Microbiology*, 103–108.

Zunabovic M., Domig KJ., 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; 351-362.

Zwietering M., de Wit J., Cuppers H., Van 't Reit K., (1994), Modeling of bacterial growth with shifts in temperatura. Applied and Enviromental Micobiology, 204-213.