



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Producción y estudio de sustancias antimicrobianas de origen
proteico de *Lactococcus lactis* cepa 115 aislada de atole agrio

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO DE ALIMENTOS

PRESENTA

CARLOS ALBERTO SOSA AGUILAR



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: GLORIA DÍAZ RUIZ
VOCAL: FRANCISCO RUÍZ TERAN
SECRETARIO: KARLA MERCEDEZ DÍAZ GUTIÉRREZ
1er. SUPLENTE: ANA LILIA CRUCES MARTÍNEZ
2° SUPLENTE: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 324, Departamento de Alimentos y Biotecnología,
Edificio E, Facultad de Química, Ciudad Universitaria.

ASESOR DEL TEMA

Dra. Gloria Díaz Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte

SUSTENTANTE

Carlos Alberto Sosa Aguilar

RECONOCIMIENTO

Al programa PAPIIT/UNAM por el apoyo económico recibido por el proyecto IN-223917 “Combinando la microbiología y bioquímica clásicas con las ómicas y las biofísicas para entender la fermentación del pozol”.

ÍNDICE	1
RESUMEN	3
ANTECEDENTES	5
FERMENTACIONES	5
ALIMENTOS FERMENTADOS	5
ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES	6
ATOLE AGRIO	6
BACTERIAS ACIDO LÁCTICAS	7
CRECIMIENTO MICROBIANO	12
BACTERIOCINAS	13
<i>Lactococcus lactis</i>	16
NISINA	18
PURIFICACION DE BACTERIOCINAS	20
ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	21
<i>Listeria monocytogenes</i>	22
LISTERIOSIS	23
JUSTIFICACIÓN	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVOS PARTICULARES	25
METODOLOGÍA	26
DIAGRAMA GENERAL	26
MICROORGANISMOS EMPLEADOS	27
REACTIVACIÓN	27
VERIFICACIÓN DE PUREZA	27
CONSERVACIÓN	28
EVALUACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO MRS	28
PREPARACIÓN DEL MEDIO LIQUIDO DEFINIDO (HSH)	30
EVALUACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO HSH	34
PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR	35
DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA	36
PURIFICACIÓN POR LA METODOLOGÍA ADSORCIÓN/DESORCIÓN	37
PURIFICACIÓN POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO	37
PRECIPITACIÓN CON TCA	38
ELECTROFORESIS SDS-PAGE	38
ZIMOGRAMA	39
SECUENCIACIÓN	40
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	41
VERIFICACIÓN DE PUREZA	41
VERIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	41
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO MRS	44
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA POR <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO MRS	50
PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO	53
ADSORCIÓN/DESORCIÓN	54
PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO	55

CARACTERIZACIÓN	58
PERFIL PROTEICO	58
VERIFICACIÓN DE CRECIMIENTO DE <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO HSH Y PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	60
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO HSH	61
EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA POR <i>Lactococcus lactis</i> CEPA 115 EN MEDIO HSH	64
PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO ANTIMICROBIANO	66
ADSORCIÓN/DESORCIÓN	66
PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO	67
CARACTERIZACIÓN	69
PERFIL PROTEICO	69
ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR	70
DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE ZIMOGRAMA	71
SECUENCIACIÓN	74
CONCLUSIONES	76
PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXOS	88

RESUMEN

El atole agrio es una bebida fermentada tradicional no alcohólica, producida y consumida en el centro y sureste de la república mexicana, elaborada a base de maíz tierno o de dobla, con o sin nixtamalizar. La fermentación ocurre por acción de los microorganismos presentes en las materias primas, utensilios y equipo empleados en su elaboración, la microbiota presente en el atole agrio es diversa estando compuesta por diversos grupos microbianos, siendo las bacterias ácido lácticas el grupo más abundante.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un amplio grupo de microorganismos que se encuentran presentes en una gran variedad de ambientes y forman parte de los alimentos fermentados, tales como el atole agrio y el pozol. Las BAL producen una gran variedad de metabolitos de interés durante su crecimiento así como compuestos con actividad antimicrobiana como ácidos orgánicos (láctico y acético), peróxido de hidrógeno, diacetilo, acetaldehído, enzimas y bacteriocinas. Estas últimas son compuestos antimicrobianos, de carácter peptídico, de bajo peso molecular, con estabilidad frente a altas temperaturas y actividad en pH ácidos.

El crecimiento microbiano está influenciado por factores como la temperatura, a_w , pH y concentración de nutrientes, que afectan directamente en el crecimiento así como en la producción de sustancias de interés; en las óptimas condiciones de crecimiento se genera mayor biomasa y generalmente mayor producción de sustancias antimicrobianas (Baker *et al.*, 1996).

Lactococcus lactis cepa 115 aislada de atole agrio produce una sustancia de origen proteico (posible bacteriocina) con actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*. Se realizaron cinéticas de crecimiento para observar el efecto de la fuente de carbono, pH y temperatura sobre el crecimiento y producción de la sustancia con actividad antimicrobiana en dos medios de cultivo, MRS y HSH. Las mejores condiciones de crecimiento y producción de la posible bacteriocina fueron; glucosa como fuente de carbono, pH inicial de 7.5 y 30 °C en medio MRS, mientras que en medio HSH las condiciones óptimas fueron; lactosa como fuente de carbono, pH inicial de 6.5 y 30 °C como temperatura de incubación. Para lograr la purificación parcial de la proteína con actividad

antimicrobiana se emplearon dos metodologías; precipitación con sulfato de amonio y el método de adsorción/desorción, con este último se eliminaron la mayor parte de las proteínas contaminantes y se obtuvo un mayor grado de purificación.

Mediante una electroforesis SDS-PAGE y un zimograma se estimó que la proteína con actividad inhibitoria producida por la cepa 115 presenta una masa molecular de 10.9 kDa.

ANTECEDENTES

FERMENTACIONES

La fermentación es un proceso catabólico que involucra la oxidación incompleta de compuestos orgánicos (sustrato) en ausencia de oxígeno, el tipo de fermentación varía dependiendo del tipo de compuesto orgánico mayoritario producido (Madigan *et al.*, 2009).

Las fermentaciones se dan de manera espontánea en la naturaleza debido a la acción de los microorganismos presentes en diversos sustratos, como por ejemplo, las fermentaciones llevadas a cabo en las frutas y verduras o durante el agriado de la leche. En la industria alimentaria, la fermentación es un proceso muy empleado para la elaboración de una gran variedad de productos como el pan, yogurt y bebidas tales como el vino y tequila.

ALIMENTOS FERMENTADOS

Los alimentos fermentados son aquellos en los que dentro de su proceso de elaboración existe una etapa de crecimiento y acción de uno o varios microorganismos como bacterias, mohos y levaduras, para llevar a cabo cambios deseables en el producto final (Van Hijum *et al.*, 2013).

La industria alimenticia ha industrializado un gran número de alimentos fermentados como el yogurt, quesos madurados, cerveza, vino, pan y vinagre, con procesos de producción controlados, utilizando normas y estándares de calidad e inocuidad para producir alimentos de buena calidad e inocuos para el consumidor; la fermentación es controlada y para llevarla a cabo se emplean cultivos iniciadores, mientras que existen otros que no han sido industrializados como el kéfir produciéndose de manera artesanal (Borresen *et al.*, 2012).

Debido al crecimiento de los microorganismos deseables así como la acumulación y concentración de sustancias producidas por estos con actividad antimicrobiana como enzimas, bacteriocinas, ácidos orgánicos, peróxido de hidrogeno, etanol y otros, se genera un efecto bioconservador en los alimentos fermentados resultando en productos seguros para su consumo debido a la inhibición de patógenos de importancia en alimentos y de microorganismos de descomposición (Harris *et al.*, 1989).

ALIMENTOS FERMENTADOS TRADICIONALES

Los alimentos fermentados tradicionales son producidos y consumidos en pequeñas regiones donde tienen una gran importancia tanto a nivel nutricional como cultural (Wacher *et al.*, 1993). Los alimentos fermentados tradicionales son aquellos en los cuales la fermentación no se lleva a cabo por la acción de un cultivo iniciador si no esta se da de forma natural por acción de los microorganismos presentes en las materias primas, utensilios y materiales empleados en su elaboración, así como en el medio ambiente (Wacher *et al.* 1993). Presentan microbiotas mixtas y complejas, que incluyen microorganismos como bacterias, hongos y levaduras (Diaz y Wacher, 2003). En México, los agaves y el maíz son los principales sustratos de los cuales se elaboran alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, entre ellos se encuentran el pozol, chorote, los atoles agrios y bebidas alcohólicas como el tesgüino, pulque y tepache (Herrera, 1993).

ATOLE AGRIO

El atole agrio es una bebida fermentada no alcohólica que se produce por la fermentación de masa de maíz, para su elaboración se emplea masa de maíz o maíz agriado con o sin nixtamalizar. En México, se producen y consumen en varias regiones como el sureste de la República así como el centro (Puebla y Tlaxcala), son elaborados bajo diferentes modalidades y diferentes tipos de maíz.

El atole agrio elaborado en Villahermosa, Tabasco se prepara utilizando maíz tierno o maíz de dobla (se dobla el tallo del maíz para permitir que se seque y evitar el desarrollo de microorganismos y plagas). Dentro de la microbiota presente en este atole agrio se han encontrado diversos grupos microbianos como las bacterias ácido lácticas, bacterias ácido lácticas amilolíticas, mesófilos aerobios, coliformes totales y levaduras, las bacterias ácido lácticas son el grupo más abundante y se han identificado *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* y *Lactococcus lactis* spp. *lactis* (Valderrama, 2012).

BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un amplio grupo de microorganismos, entre sus principales características destacan; ser microorganismos con forma cocoide, bacilar o cocobacilar, Gram positivos, mesófilos (crecen en un rango de temperatura entre 5°C – 45 °C), ácido tolerantes (capaces de crecer en medios con un pH: 6-9 y activas inclusive en valores de entre 4-4.5), aerobias facultativas o anaerobias, no móviles, no formadores de esporas, catalasa y oxidasa negativas y son exigentes en su nutrición (Carr *et al.*, 2002). Crecen en medios complejos necesitando de aminoácidos, bases nitrogenadas y vitaminas del complejo B para crecer. Forman colonias pequeñas de color beige.

Antiguamente se reconocían 4 géneros de bacterias ácido lácticas; *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* pero actualmente se reconocen alrededor de 20 géneros de los cuales 12 están asociados con alimentos, entre los géneros más representativos se encuentran; *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella*.

La presencia de bacterias ácido lácticas se asocia con hábitats ricos en nutrientes como los alimentos pero también se encuentran en un variado número de ambientes como;

- Leche y derivados
- Productos cárnicos
- Superficies y tejidos vegetales
- Alimentos fermentados tradicionales
- Tracto gastrointestinal de mamíferos

Son consideradas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras), con un gran uso a nivel industrial, siendo empleadas como cultivos iniciadores para un gran número de alimentos fermentados como yogurt, quesos, kéfir y productos cárnicos fermentados (Bintsis, 2018).

La clasificación de las BAL se da con base en su morfología, crecimiento a ciertas temperaturas (mesófilas y termófilas), tipo de azúcar del cual obtienen

energía, y tipo de ácido láctico que producen (L, D o ambos), así como la vía por la cual llevan a cabo la fermentación.

Las BAL son capaces de metabolizar diversos carbohidratos y obtener energía a partir de ellos, dependiendo del tipo de vía por la cual lleven a cabo la fermentación se pueden clasificar en homofermentativas, producen como único metabolito el ácido láctico y heterofermentativas, las cuales producen ácido láctico además de otros metabolitos como ácido acético, etanol y CO₂.

Homofermentativas

Las bacterias ácido lácticas homofermentativas convierten a los carbohidratos en ácido láctico por medio de la glicólisis (vía Embden-Meyerhof), la glucosa se transforma en piruvato el cual es el aceptor final de electrones y es reducido a ácido láctico, el cual es el único metabolito (alrededor del 85-90% es convertido en ácido láctico) (Figura 1).

Por mol de glucosa se obtienen 2 moles de ácido láctico y un rendimiento de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa fermentada (De Vuyst y Vandamme, 1994). Los géneros de BAL que presentan este tipo de fermentación son; *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus* y algunas especies de *Lactobacillus*.

Heterofermentativas

La vía heterofermentativa empleada por las BAL se caracteriza por utilizar la vía de las pentosas fosfato para llevar a cabo la fermentación de los azúcares, debido a que algunas especies de BAL carecen de la enzima fructosa-1,6-difosfato aldolasa, pero si presenta la enzima cetolasa, por lo cual pueden llevar a cabo la fermentación de azúcares por la vía de las pentosa fosfato. Esta vía metabólica produce aparte de ácido láctico como metabolito final (aproximadamente el 50%) ácido acético, etanol y CO₂.

Por mol de glucosa se obtiene 1 mol de ácido láctico, 1 mol de etanol y 1 mol de CO₂, solo se genera 1 mol de ATP, generando un menor rendimiento por molécula de glucosa fermentada (figura 2) (De Vuyst y Vandamme, 1994).

Los géneros de BAL que presentan este tipo de fermentación son; *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium* y algunas especies de *Lactobacillus*.

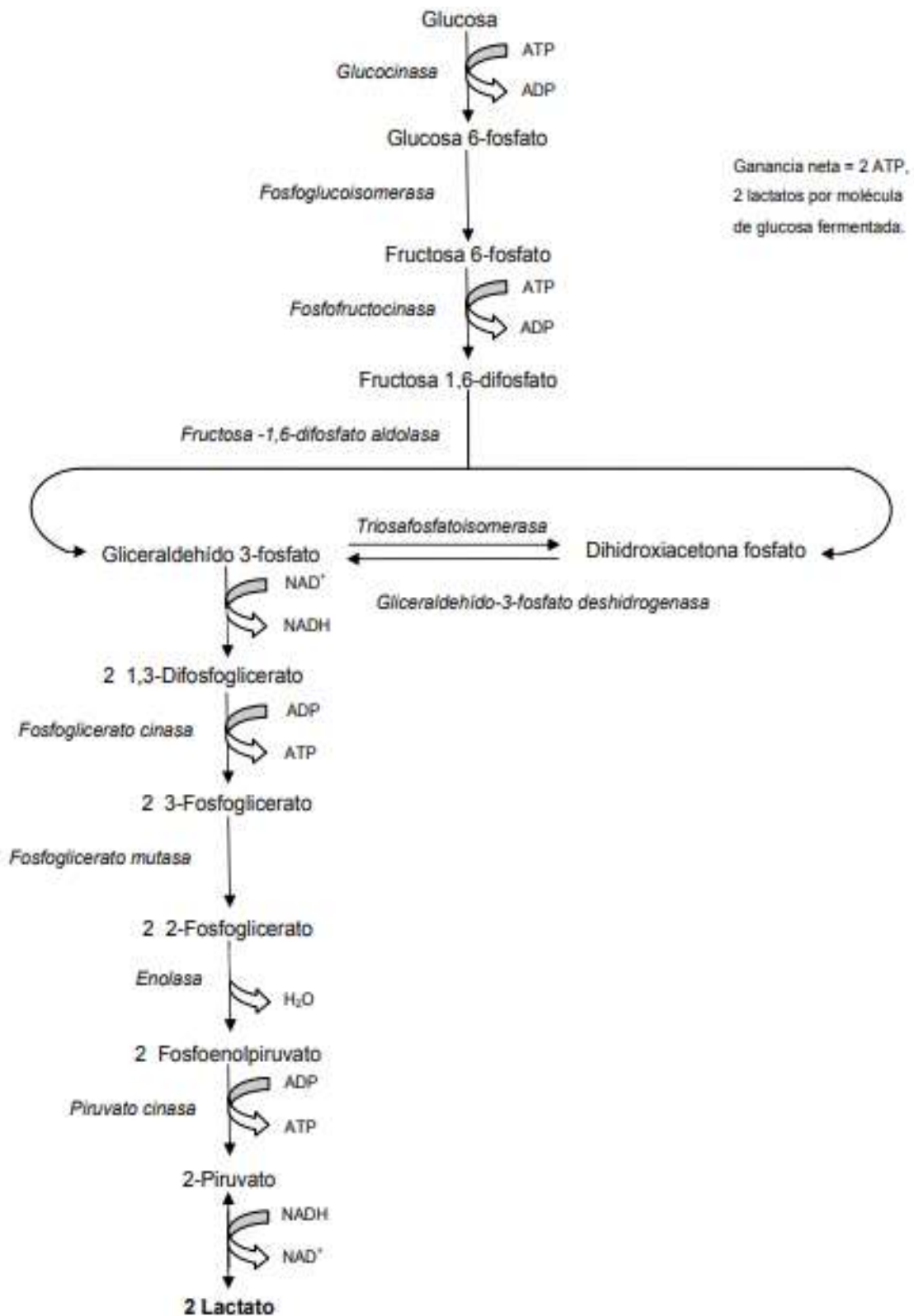


Figura 1. Fermentación homofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Tomada de Mora y García, 2007).

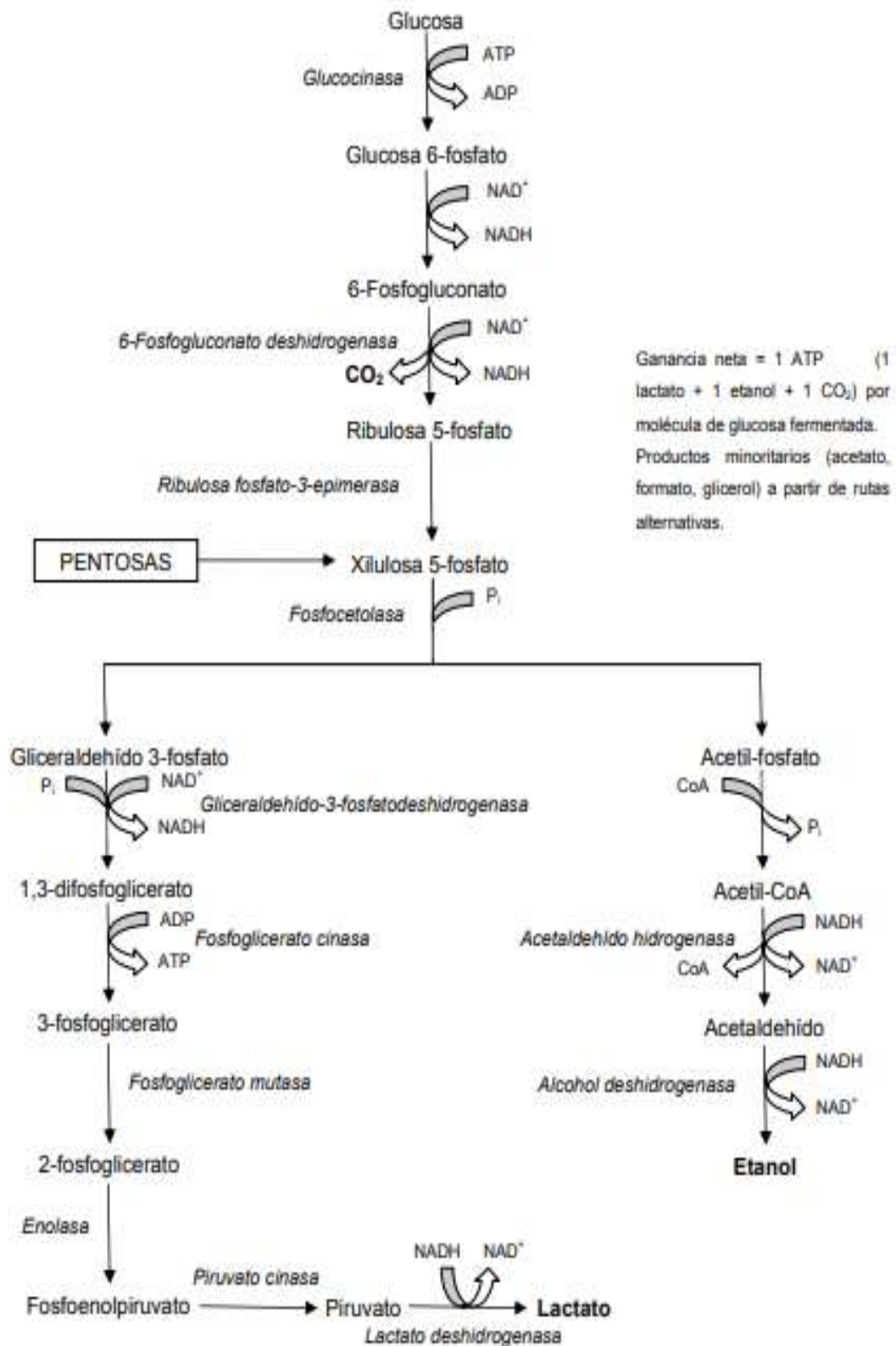


Figura 2. Fermentación heterofermentativa de la glucosa por bacterias ácido lácticas (Tomada de Mora y García, 2007).

Las bacterias ácido lácticas son muy exigentes en su nutrición, requiriendo de una gran cantidad de nutrimentos como aminoácidos, bases nitrogenadas, vitaminas (especialmente del grupo B), minerales y carbohidratos, la mayoría de las BAL obtienen energía únicamente de la fermentación de los hidratos de carbono, por lo cual su crecimiento está condicionado a ambientes ricos en carbohidratos (Leveau y Bouix, 2000), debido a su baja capacidad anabólica el rendimiento en sus cultivos se ve reducido (Walker, 2000).

Las BAL producen una gran cantidad de compuestos durante su crecimiento como el ácido láctico (empleado en la industria), así como una variedad de compuestos con actividad antimicrobiana empleados en la industria para la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables y/o patógenas en los alimentos, dentro de estos compuestos se encuentran los ácidos orgánicos (láctico y acético), derivados del metabolismo del O_2 (H_2O_2), diacetilo, acetaldehído, enzimas (proteasas y peptidoglucanohidrolasas) y bacteriocinas (Dahl y col., 1989; Jay, 2000; De Vuyst y Vandame, 1994).

CRECIMIENTO MICROBIANO

El crecimiento microbiano está determinado por la misma naturaleza del microorganismo así como en la naturaleza del ambiente donde se desarrolla. Varios factores tales como; la temperatura, pH, actividad de agua (a_w), fuerza iónica, concentración de oxígeno, concentración y disponibilidad de los nutrientes tienen un efecto tanto sinérgico (positivo) o antagónico (negativo) sobre el crecimiento microbiano (Eifert *et al.*, 1996).

La composición del medio donde se desarrollan los microorganismos tiene un importante efecto sobre el crecimiento, el tipo de fuente de carbono y nitrógeno presentes así como su concentración son factores determinantes sobre el crecimiento así como en la velocidad de crecimiento y viabilidad (De Vuyst, 1995; Yang *et al.*, 1994).

La temperatura es un factor que tiene un gran impacto sobre la velocidad del crecimiento debido a la sensibilidad que tienen las reacciones catalizadas por enzimas al aumento de temperatura. La velocidad de reacción aumenta al aumentar la temperatura produciendo que el metabolismo sea más rápido., sin embargo temperaturas muy elevadas producen daños sobre la viabilidad de los microorganismos al desnaturalizar diversas proteínas ya sea con actividad catalítica (enzima) o proteínas transportadoras y de membrana (Prescott *et al.*, 1999).

El pH del medio es un factor que puede favorecer el crecimiento de los microorganismos, para cada bacteria existe un rango de pH óptimo para su crecimiento. Puede afectar de manera negativa al ocasionar la ionización de los nutrientes y disminuir la biodisponibilidad de ellos (Prescott *et al.*, 1999) así como resultar en daños inespecíficos en la célula (Terence, 1968).

BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas son compuestos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas (Jeevaratnam *et al.*, 2005), de naturaleza proteica, químicamente se tratan de péptidos heterogéneos de bajo peso molecular y que presentan un amplio rango de actividad con diferentes mecanismos de acción y propiedades fisicoquímicas (Álvarez, 2008). Generalmente la acción de las bacteriocinas es frente a bacterias relacionadas taxonómicamente con la cepa productora (Tagg *et al.*, 1976). Son metabolitos primarios, producidos durante el crecimiento bacteriano, sintetizadas a nivel ribosomal, secretados extracelularmente y conformados por un rango de entre 20 y 60 aminoácidos. Entre las características fisicoquímicas de las bacteriocinas están el tener un punto isoeléctrico entre valores de pH de 8-10, tener una alta estabilidad al calor y ser activas en pH ácidos. La estabilidad presentada por las bacteriocinas se debe a sus regiones hidrofóbicas, su estructura globular y a los enlaces cruzados.

La clasificación de las bacteriocinas está dada por la estructura que presentan, así como en sus propiedades fisicoquímicas y espectro de acción. Clase I lantibioticos. Se trata de un grupo que incluye péptidos pequeños de entre 19-38 aminoácidos, policíclicos con un tamaño menor a 5 kDa, termolábiles y que son sintetizados como prepéptidos en el ribosoma y son modificados posteriormente por la deshidratación de serina y treonina, dando como resultado aminoácidos modificados como dehidroalanina y dehidrobutirina respectivamente.

- Clase Ia: péptidos de forma elongada, que presentan aminoácidos anfipáticos, con un peso menor a los 4kDa, presentan una carga neta negativa y actúan sobre la membrana citoplasmática, despolarizándola y causando daño en ella.
- Clase Ib: péptidos con forma globular, hidrófobos y con un tamaño entre los 1 y 2 kDa, su actividad inhibitoria está relacionada con la inhibición enzimática.

Clase II no lantibioticos: las bacteriocinas dentro de este grupo presentan un tamaño menor a 10 kDa, conformados por 30 y 60 aminoácidos, no contienen aminoácidos modificados, presentan una alta estabilidad al calor y a un amplio rango de pH.

- Clase IIa: bacteriocinas con alta actividad frente a *Listeria monocytogenes*, presentan una secuencia amino terminal común (-Try-Gly-Asn-Val-Xaa-Cys-) y uno o dos puentes disulfuro.
- Clase IIb: bacteriocinas conformadas por 2 péptidos, dependiendo de su actividad antimicrobiana, puede darse la presencia de ambos en proporciones similares; presentan una secuencia amino terminal común (-Try-Gly-Asn-Val-Xaa-Cys-) y su acción es mediante la formación de poros en la membrana celular.
- Clase IIc: bacteriocinas con estructura cíclica, sin modificaciones postraduccionales y no presentan la secuencia amino terminal que presentan las clases IIa y IIb.

Clase III bacteriolisinas: este grupo incluye a bacteriocinas denominadas “bacteriolisinas” son termolábiles, con pesos moleculares mayores a 30kDa, su mecanismo de acción es por la hidrolisis de la pared celular (Beristain-Bazua, 2012).

Las bacteriocinas actúan sobre la membrana celular interfiriendo en su integridad mediante la formación de poros y la despolarización, conduciendo a la salida de iones y pequeñas moléculas como aminoácidos y ATP, alterando la fuerza motriz empleada para la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

Los lantibioticos (Clase I) presentan un mecanismo de acción sobre la membrana citoplasmática debido a la formación de poros, algunas bacteriocinas de esta clase como la nisina presentan un modo de acción dual; en la primera etapa se une a la pared celular debido a atracciones electroestáticas posteriormente se une al lípido II de la membrana celular (principal transportador de las subunidad de peptidoglucano) impidiendo la correcta síntesis de la pared celular, en una segunda etapa se acopla a la membrana celular produciendo un poro transmembranal que genera la salida de moléculas pequeñas y iones.

Los no lantibioticos (clase II) debido a su estructura anfifílica actúan sobre la membrana celular al reconocer receptores sobre su superficie y posteriormente insertándose en ella generando la despolarización de la membrana celular.

Las bacteriolisinas (clase III) presentan un mecanismo de acción diferente en comparación con la clase I y II debido a que actúan sobre la pared celular. La región C-terminal de las bacteriolisinas se encarga de reconocer la pared de la célula blanco mientras que la región N-terminal presenta una homología con una endopeptidasa (Mondragon *et al.*, 2013) en cuanto a acción lo que produce la lisis de la pared (figura 3).

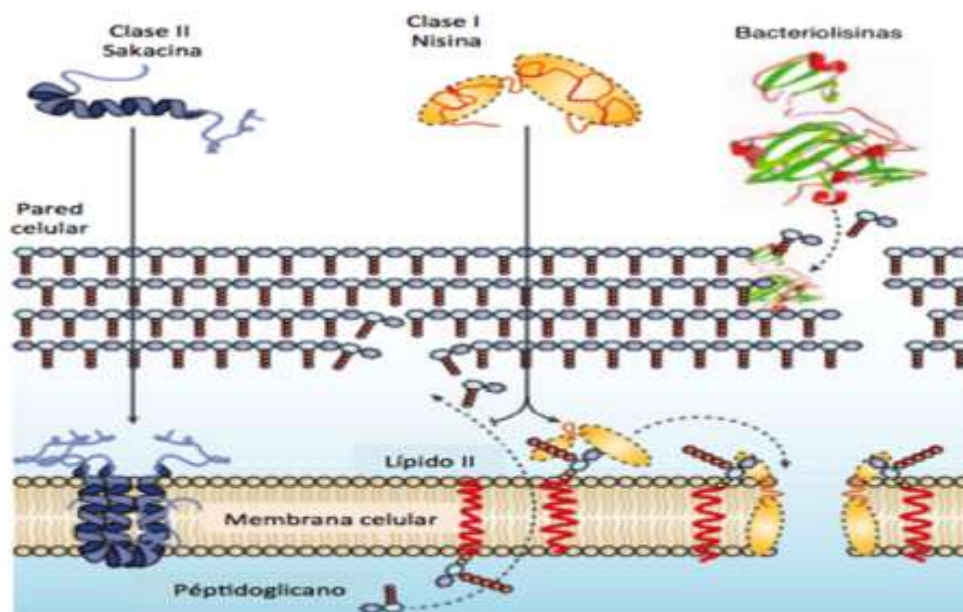


Figura 3. Mecanismo de acción de lantibioticos (clase I), no lantibioticos (clase II) y bacteriolisinas (Tomado de Beristain-Bauza *et al.*, 2012).

Las bacteriocinas producidas por las BAL tiene una gran importancia en la industria e investigación debido a su nula toxicidad frente a células eucariontes (debido a que son degradadas por enzimas digestivas; De Arauz *et al.*, 2009) y su capacidad de inhibir una gran variedad de bacterias, su acción se da principalmente frente a bacterias Gram positivas (Jack *et al.*, 1995) aunque también suelen tener acción contra bacterias Gram negativas (Chung y Yousef, 2005; Meira *et al.*, 2000). Las bacteriocinas producidas por las BAL son una opción atractiva en la industria alimentaria como conservadores naturales en

alimentos mínimamente procesados o en productos procesados empleando una combinación con otros tratamientos como; proceso térmico, salado y altas presiones hidrostáticas (Heredia-Castro *et al.*, 2017); manteniendo la inocuidad del alimento debido a su acción inhibitoria frente a microorganismos de descomposición y patógenos alimentarios de importancia como *Listeria monocytogenes*.

Tabla 1. Bacteriocinas producidas por BAL reportadas en la literatura (Adaptado de Parra, 2010 y Llorente, 1998).

Bacteria ácido láctica productora	Bacteriocina
<i>Lactococcus lactis</i>	Nisina, Lactococcina, Lacticina, Diplococcina y Lactostrepcina
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Lactacina
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticina
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Plantaricina
<i>Lactobacillus fermentum</i>	Fermenticina
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvaticina
<i>Lactobacillus sake</i>	Sakacina, Lactocina
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocina CH5, Lactocidina. Acidophilina,
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesenterocina
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocina
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocina F, Ach y PA-1
<i>Carnobacterium psycicola</i>	Psicicolina, Carnocina
<i>Streptococcus macedonicus</i>	Macedocina
<i>Weissella paramesenteroides</i>	Weisellina A

La nisina y la pediocina PA-1 están aprobadas para su uso como bioconservadores en alimentos (Simha *et al.*, 2012) (tabla 1). La nisina es la bacteriocina comercial más importante y fue la primera que se aprobó para su uso en la industria alimentaria (Delves-Broughton, 1996).

Lactococcus lactis

Se trata de una bacteria ácido láctica, originalmente denominada “*Streptococcus lactis*”, aislada de la superficie de plantas (Stark y Sherman, 1935, Bolotin *et al*, 2001) y posteriormente renombrado como *Lactococcus* en 1985 (Schleifer *et al*, 1985). Es un microorganismo Gram positivo, con una morfología ovoide que se agrupa en duplas o en cadenas cortas, no móvil y con un metabolismo estrictamente homofermentativo.

Hoy en día se conocen 5 subespecies siendo *Lactococcus lactis* subespecie *cremoris* y subespecie *lactis* las más empleadas y estudiadas por su capacidad de producir una gran variedad de compuestos de interés.

L. lactis presenta un metabolismo estrictamente homofermentativo y tiene la capacidad de utilizar una gran cantidad de carbohidratos como fuente de carbono como; glucosa, lactosa, sacarosa, manosa, maltosa, galactosa y fructosa (Sandine *et al.*, 1962); las cepas aisladas de fuentes vegetales presentan un mayor potencial metabólico en comparación con las cepas aisladas de productos lácteos. Dicha capacidad se ve reflejado en el uso de una gama más amplia de carbohidratos, lo que aumenta su capacidad biosintética de péptidos y polipéptidos (Golomb y Marco, 2014). La arginina es el único sustrato diferente a un hidrato de carbono reportado que *L. lactis* puede emplear como fuente de carbono para la obtención de energía (Barker, 1961).

Ambas subespecies de *L. lactis* (*lactis* y *cremoris*) requieren de la presencia de; valina, ácido glutámico, metionina, leucina, isoleucina, histidina y arginina en los medios de cultivo donde se desarrollan, ya que son aminoácidos esenciales para ambos microorganismos mientras que el ácido aspártico y cisteína estimulan su crecimiento, pero no son esenciales.

Entre las vitaminas esenciales para el crecimiento de este microorganismo se encuentran el ácido nicotínico, ácido pantoténico y biotina, mientras que la riboflavina y la tiamina estimulan su crecimiento (Terence, 1968).

Lactococcus lactis tiene una gran presencia en leche cruda, cuajada y derivados lácteos como quesos y yogurt, así como en fuentes vegetales. Este microorganismo es empleado en la industria de alimentos debido a la producción de aromas en los productos fermentados, así como por su capacidad de producir ácido láctico actuando como un bioconservador. Además de producir compuestos con actividad antimicrobiana como la nisina, bacteriocina aprobada por la FDA para uso en alimentos como conservador.

NISINA

Se trata de una bacteriocina de clase I producida por *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, está constituida por 34 aminoácidos (entre ellos deshidroalanina y dehidrobutirina) con un peso molecular de 3.4 kDa (figura 4).

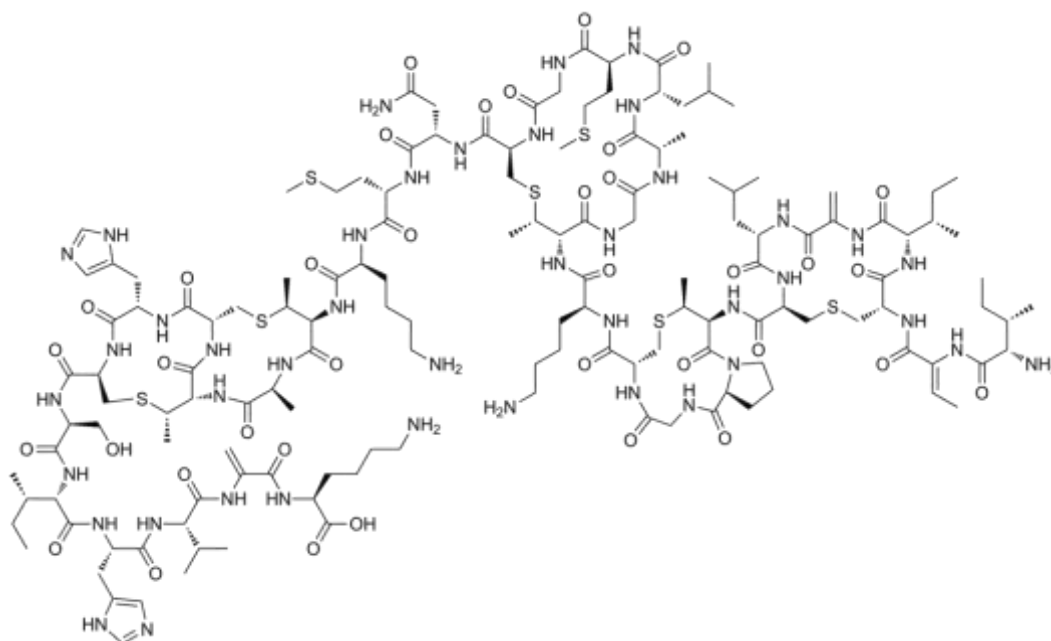


Figura 4. Estructura química de la Nisina (Salmieri, 2014).

En 1969 fue reconocida por la FAO como un conservador en alimentos pero fue hasta 1988 cuando la FDA le concedió en estatus de GRAS y aprobó su uso como aditivo en alimentos y fue establecido en el código federal de regulación (CFR) bajo el título 21 apartado 184 de la sección 184.1538, codificada como E 234 aprobando su uso en 50 países (Delves-Broughton *et al.*, 1998).

La nisina se comercializa como preparado que contiene nisina 2.5 %, NaCl 7.5% y leche en polvo sin grasa denominada Nisaplin® distribuido por Aplin y Barre en Inglaterra.

Entre otras presentaciones comerciales se encuentran;

- Chrisin por Chr. Hansen en Dinamarca
- Ambicin por AMBI Inc. en los Estados Unidos

La actividad de 1g de nisina pura es de 40 UI (UI =unidades internacionales es la cantidad necesaria de nisina para inhibir una célula de *Streptococcus agalactiae* en 1mL) (López-Malo *et al.*, 2005). En alimentos se permite el uso de 250 ppm de nisina en producto terminado, es empleada en la industria alimenticia para la inhibición principalmente de *Clostridium botulinum* en alimentos enlatados y quesos madurados y *Listeria monocytogenes* en alimentos pasteurizados (tabla 2).

Tabla 2. Aplicaciones de la nisina en diversos productos de la industria alimentaria.

Producto	Cantidad	Fuente
Leche pasteurizada	0.25-10 mg/L	Delves-Broughton, 2005
Huevo líquido	250 mg/mL	Jin, 2010
Jugo de zanahoria	10 UI/mL	Phatanibul <i>et al.</i> , 2009
Jugo de manzana	10 UI/mL	Phatanibul <i>et al.</i> , 2009
Salchichas	5.25 mg/Kg	Delves-Broughton , 2005
Cerveza	3 mg/L	Franchie <i>et al.</i> , 2012
Queso ricotta	1.25 mg/ 100g	Delves-Broughton, 2005
Queso cheddar	300 UI/g	Benech <i>et al.</i> , 2012; Zottola; <i>et al.</i> ,1994
Queso en polvo	1.25 mg/100 g	Artículos del Capítulo VIII – Alimentos Lácteos del Código Alimentario Argentino.

PURIFICACION DE BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas al ser de carácter proteico se pueden purificar empleando metodologías para la purificación de proteínas como es el caso de la precipitación con sulfato de amonio, la precipitación con TCA y precipitación con solventes orgánicos (cloroformo, metanol o acetona); así como metodologías diseñadas para la purificación de bacteriocinas como la metodología de adsorción/desorción (Yang *et al.*, 1992) la cual fue mejorada al incluir metanol para la etapa de desorción lo que aumenta la liberación de las bacteriocinas al medio, mejorando el rendimiento en los procesos de purificación (Atrih *et al.*, 2001).

Debido al interés tanto científico como tecnológico para el estudio de las bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas se han desarrollado diversas metodologías y combinaciones de ellas para lograr purificarlas, concentrándolas y eliminando la mayor parte de proteínas contaminantes aportadas por el medio o demás sustancias proteicas producidas por las BAL, no existe un único protocolo de purificación aplicable a todas las bacteriocinas producidas por BAL, para el desarrollo de una estrategia para la purificación de alguna bacteriocina en especial se requiere tomar en cuenta las características de la bacteria productora, el medio de cultivo donde se hizo crecer a la bacteria, las características físicas y químicas de las posibles bacteriocinas así como el tiempo y el costo de las metodologías a emplear, dentro de las metodologías se encuentran (Pingitore *et al.*, 2007);

- Método adsorción/desorción
- Precipitación con sulfato de amonio
- Precipitación con solventes orgánicos
- Cromatografías de exclusión molecular
- Ultrafiltración
- Filtración en gel
- Cromatografía de intercambio iónico (catiónico y aniónico)
- Cromatografía de interacción hidrofóbica
- Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)
- Cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa

ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) son aquellas causadas por agentes etiológicos presentes en los alimentos y/o agua contaminados en cantidades tales que afectan a la salud y bienestar del consumidor, constituyen uno de los problemas de salud pública más comunes y una gran problemática mundial debido al impacto económico que representan por la reducción en la productividad y el comercio, incremento de los costos a los servicios de salud así como por la alta morbilidad y mortalidad que presentan. La OMS (Organización Mundial de la Salud) estima que, en el mundo, la incidencia anual de diarreas asociadas a ETA es de 1.500 millones de casos y 3 millones de niños menores de 5 años mueren anualmente (Bolaños-Acuña *et al*, 2007). Las ETA se caracterizan por presentar una gran variedad de síntomas gastrointestinales tales como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal así como fiebre y algunas complicaciones mayores tales como septicemia y meningitis y afectan principalmente a niños, mujeres embarazadas, ancianos y personas con otros padecimientos.

Clasificación de la ETA:

- Infecciones son enfermedades causadas por la ingestión de alimentos contaminados con agentes infecciosos vivos tales como bacterias (*Salmonella*, *Shigella*), virus (norovirus) y parásitos (*Trichinella spiralis*).
- Intoxicaciones son aquellas enfermedades causadas por la ingestión de alimentos que presentan toxinas de origen microbiano (toxinas producidas por *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) o agentes químicos tales como; desinfectantes, pesticidas o metales pesados.
- Infecciones mediadas por toxinas o toxiinfecciones son aquellas enfermedades donde el alimento ingerido presenta a los agentes patógenos así como toxinas producidas por los mismos.

Entre los agentes etiológicos destacan los agentes biológicos como bacterias, hongos, virus y parásitos presentes en los alimentos, la FDA enlista los 14 patógenos más comunes causantes de ETA; norovirus, *Campylobacter jejuni*, *Costridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* (EPEC),

Salmonella Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica* y *Listeria monocytogenes*.

Listeria monocytogenes

L. monocytogenes pertenece a la familia *Listeriaceae* y se trata de una de las dos especies patógenas del género *Listeria*, *L. ivanovi* generalmente es asociada a rumiantes mientras que *L. monocytogenes* es patógena tanto para animales como para humanos. Es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, catalasa positiva y oxidasa negativo, con un tamaño de 0.5-2 de largo * 0.5 micras de ancho, móvil (a 20-30 °C), formador de biopelículas, psicótrofo y patógeno intracelular facultativo.

Se puede encontrar en una gran variedad de ambientes como:

- Suelos
- Agua
- Heces
- Animales infectados
- Alimentos como: carnes crudas, leche sin pasteurizar, vegetales y productos procesados como quesos de pasta blanda, embutidos y pescados (Farber & Peterkin, 1991).

Presenta una alta resistencia al calor, así como una viabilidad a temperatura de congelación (Wilkins *et al.*, 1972), presentando un amplio rango de crecimiento (-18 °C a 45 °C) y un rango de pH de 3.3 a 9.6, así como su tolerancia a concentraciones de sal de 20%, debido a estas características presenta alta resistencia a las condiciones de procesamiento y es considerado un patógeno de gran importancia a nivel de salud pública (Harris *et al.*, 1989). Está ampliamente distribuido en el medio ambiente y tiene la capacidad de colonizar las plantas de procesamiento de alimentos prevaleciendo varios meses e incluso años formando biopelículas, que actúan como defensa frente a la limpieza y desinfección (Carrillo *et al.*, 2010), favoreciendo la supervivencia en las superficies que están en contacto con los alimentos, produciendo la contaminación de los mismos.

LISTERIOSIS

La listeriosis es una infección bacteriana causada por *L. monocytogenes*, que afecta tanto a humanos como animales, los serotipos 1/2/a, 1b y 4b son los principales causantes de las infecciones, siendo el serotipo 4b aislado en un gran número de brotes (The Center for Food Security and Public Health, 2004-2019).

Listeria monocytogenes tiene la capacidad de sobrevivir y prevalecer en el tracto gastrointestinal, colonizar el intestino y atravesar la barrera intestinal, la hemato-encefálica y placenta. Logrando invadir una amplia gama de células debido a sus factores de virulencia como la internalina (*InA* y *InB*), las cuales le permiten la invasión celular y la listeriolisina O y fosfolipasa que permiten lisar a las células fagocitarias.

La infección se puede presentar en varias formas clínicas; invasiva (listeriosis invasiva) y no invasiva (listeriosis gastrointestinal no invasiva) e incluye síntomas como la fiebre, náuseas, vómitos, diarrea. La infección en humanos se da principalmente por la ingesta de alimentos contaminados como pueden ser; carnes, pescados, vegetales crudos y lácteos no pasteurizados así como productos refrigerados como helados, patés y quesos; la dosis infectiva se estima entre 10^4 - 10^6 UFC/g de alimento ingerido y afecta principalmente a niños, ancianos, mujeres embarazadas y personas inmunocomprometidas e inmunodeficientes. En personas susceptibles la dosis infectiva puede ser menor a 0.3 UFC/g; se estima que entre el 1 y 10 % de la población mundial es portadora asintomática de *L. monocytogenes* en los intestinos aunque raramente se desarrolla la enfermedad en personas sanas.

Entre los grupos susceptibles la listeriosis tiene una mortalidad de aproximadamente el 20-30 %.

JUSTIFICACIÓN

Dentro de los microorganismos capaces de desarrollarse en los alimentos se encuentran los patógenos y los de descomposición, que afectan directamente la calidad del producto y comprometen la salud del consumidor. Las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs), producidas por microorganismos, son un problema de salud pública común y de gran importancia, debido al impacto negativo sobre la industria alimentaria. Para asegurar la inocuidad de los productos alimenticios se emplean una serie de tratamientos y procesos para la destrucción e inhibición de microorganismos patógenos, sin embargo, los consumidores demandan alimentos de buena calidad, nutritivos, con el menor procesamiento posible y libre de conservadores químicos, por lo cual el uso de conservadores naturales como las bacteriocinas es una alternativa atractiva.

Las bacteriocinas producidas por BAL son de interés industrial debido a su nula toxicidad frente a células eucariontes y a su actividad frente a microorganismos patógenos presentes en alimentos como *Listeria monocytogenes* (Axelsson, 1993), un patógeno de gran importancia a nivel de salud pública debido a su resistencia a las condiciones de procesamiento (Harris *et al.*, 1989). En la actualidad, una gran cantidad de trabajos se han enfocado en el estudio de las bacteriocinas producidas por las BAL. La FDA aprobó en 1985 a la nisina, bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*, como conservador para su uso en alimentos (Delves-Broughton *et al.*, 1996).

Lactococcus lactis cepa 115 aislada de atole agrio produce una sustancia con actividad antimicrobiana (posible bacteriocina), para el uso de este compuesto en alimentos como conservador es necesario purificar y caracterizar dicha sustancia.

HIPOTESIS

Si *Lactococcus lactis* cepa 115 aislada del atole agrio produce una sustancia con actividad antimicrobiana será posible concentrarla y purificarla parcialmente para su estudio, presentará un carácter proteico, un bajo peso molecular y será termo resistente.

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante el estudio de la sustancia antimicrobiana producida por *Lactococcus lactis* cepa 115, que es una posible bacteriocina.

OBJETIVOS PARTICULARES

Conocer las condiciones óptimas (fuente de carbono, pH inicial del medio y temperatura de incubación) para el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115.

Encontrar las mejores condiciones para la producción de la sustancia con actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* de *Lactococcus lactis* cepa 115.

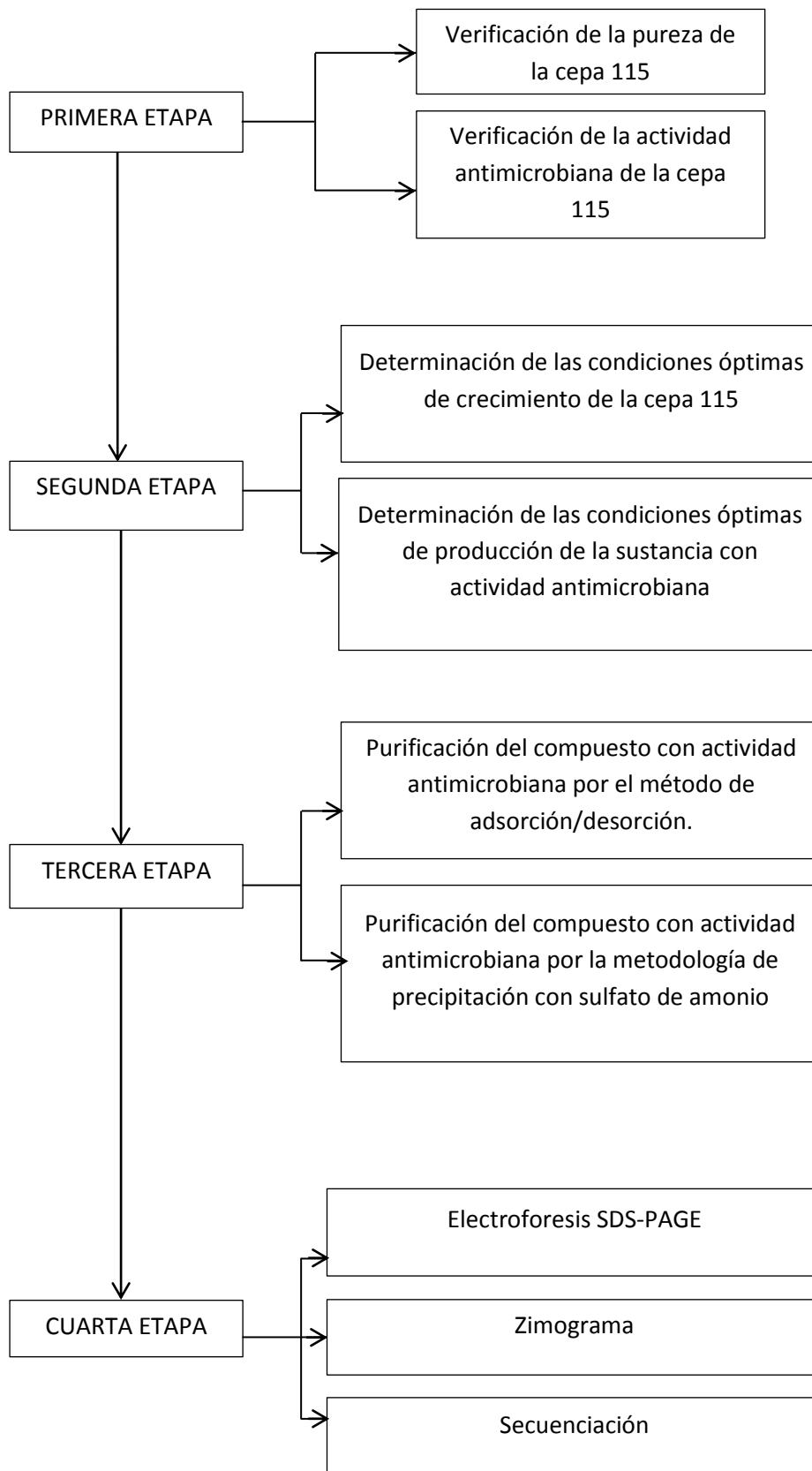
Concentrar y purificar parcialmente la sustancia con actividad antimicrobiana producida por *Lactococcus lactis* cepa 115 empleando y comparando dos metodologías; precipitación con sulfato de amonio y el método de adsorción/desorción.

Estimar la masa molecular de la sustancia con actividad antimicrobiana mediante una electroforesis SDS-PAGE y un zimograma.

Obtener la secuencia de aminoácidos de la sustancia con actividad antimicrobiana (posible bacteriocina).

METODOLOGÍA

DIAGRAMA GENERAL



MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

Los microorganismos utilizados en el presente proyecto se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Cepas empleadas durante la actividad experimental.

Cepa	Origen	Conservación
<i>Lactococcus lactis</i> cepa 115	Atole agrio (Maldonado, 2016)	Medio MRS con 20 % glicerol a – 70 °C
<i>Streptococcus</i> spp. cepa 33	Pozol, Villahermosa Tabasco (Tavera, 2010)	Medio MRS con 20 % glicerol a – 70 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> CFQ-103	Ceparío, Facultad de química UNAM	Medio BHI con 20 % glicerol a – 70 °C
<i>Listeria innocua</i> 2	Ceparío, Facultad de química UNAM	Medio BHI con 20 % glicerol a – 70 °C

REACTIVACIÓN.

Las cepas se reactivaron inoculando 5 mL de medio MRS (para las bacterias ácido lácticas; cepa 115 y 33) y BHI (*Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*) al 1% a partir de crio cultivos conservados en glicerol a – 70°C, incubándose a 30 °C (BAL) y 37 °C (*Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*) durante 24 horas y realizando una segunda inoculación en 5 mL de los medios correspondientes al 1 % a partir de los cultivos de 24 horas.

VERIFICACION DE PUREZA.

La verificación de la pureza de la cepa 115 se determinó observando las características microscópicas y macroscópicas de un cultivo de la cepa 115 de 24 horas de crecimiento en medio MRS incubado a 30°C.

Características microscópicas: Tinción de Gram y observación al microscopio (100x), observando el Gram, la morfología y el agrupamiento de las células.

Características macroscópicas: Por siembra por agotamiento en agar MRS para observar la morfología (tamaño, color y apariencia) y homogeneidad de las colonias desarrolladas.

CONSERVACION.

La conservación de cepas se realizó después de verificar la pureza de la cepa 115. Las cepas se reactivaron como se describió anteriormente, se colocó 1 mL del cultivo en un microtubo estéril y se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante y al pellet se adicionó 1 mL más del cultivo y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones (este paso se realizó 3 veces); el pellet se lavó 2 veces con solución salina estéril 0.8%, el pellet lavado se re suspendió en 1.5 mL de caldo MRS con glicerol al 20% y se colocó en crio tubos que se almacenaron a -70 °C.

EVALUACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO MRS

La evaluación del crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS se realizó en una primera etapa variando la fuente de carbono, empleando 5 carbohidratos diferentes (glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa). El crecimiento de la cepa 115 se determinó mediante la presencia de turbidez en un matraz con 25 mL de caldo MRS inoculados al 1% e incubados a 30°C, pH inicial de 6.5 tras 24 horas de fermentación.

A continuación, la evaluación de las condiciones óptimas de crecimiento se realizó mediante el monitoreo del crecimiento en medio MRS con glucosa como fuente de carbono a diferentes temperaturas manteniendo constante el valor inicial de pH (6.5) del medio de cultivo, y posteriormente variando el valor inicial de pH del medio y manteniendo la temperatura de incubación constante (30 °C), tal como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de temperatura y pH evaluadas en las diferentes fermentaciones de *L. lactis* cepa 115 realizadas en medio MRS con glucosa como fuente de carbono.

Fermentación No.	Temperatura de incubación (°C)	pH inicial del medio
1	30	6.5
2	37	6.5
3	42	6.5
4	30	5.5
5	30	7.5
6	30	8.0
7	30	8.5

Todas las fermentaciones se llevaron a cabo en 250 mL de caldo MRS inoculado al 1% v/v con un cultivo de *L. lactis* cepa 115 reactivado, tal como se describió previamente. Los matraces inoculados se incubaron 24 horas a las diferentes temperaturas (30, 37 y 42°C) para las primeras 3 fermentaciones. En la segunda etapa las 4 fermentaciones se llevaron a cabo manteniendo el valor de temperatura constante (30°C) y ajustando el pH inicial del medio a diferentes valores (5.5, 7.5, 8.0 y 8.5) con HCl 1N y NaOH 2M respectivamente.

Para todas las fermentaciones se tomaron muestras a los tiempo 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5 y 24 horas, se monitoreó la densidad óptica midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis), el pH (potenciómetro Orion 410A+) y se evaluó el crecimiento mediante el conteo en placa en agar MRS: se tomaron 0.5mL de las muestras obtenidas durante las diferentes etapas de la fermentación se diluyeron en 4.5 mL de solución salina al 0.8% estéril, se agitaron para homogeneizar y se realizaron diluciones seriadas consecutivas.

Se inocularon 100 µL de las diluciones y se extendieron homogéneamente con asa de metal estéril por la superficie de una placa de agar MRS, posteriormente se incubaron a 30 °C durante 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se observaron las colonias desarrolladas, se tomaron en cuenta las colonias pequeñas, circulares, convexas y de color blanco y se consideraron las placas con un numero de entre 25-250 colonias (rango estadístico) (Camacho *et al.*, 2009).

PREPARACION DEL MEDIO LÍQUIDO DEFINIDO (HSH)

El medio de cultivo HSH contiene los nutrientes necesarios para el crecimiento de bacterias ácido lácticas (Owens-Keddie, 1969).

Para la preparación del medio líquido definido se realizaron soluciones stock de los distintos nutrimentos y posteriormente se mezclaron para obtener el medio HSH y se empleó el equipo Millipore (SX00025) de 25 mm de diámetro y se colocaron membranas de filtración de 25 mm de diámetro y 0.22 μm de diámetro de poro (Millipore GSWP025).

Mezcla de Minerales

En la tabla 5 se muestran los minerales de los que se realizaron las soluciones stock; una vez preparadas estas se almacenaron en refrigeración (4-6 °C).

Tabla 5. Soluciones stock de minerales

Mineral	g/1000 mL
K_2HPO_4	200
KH_2PO_4	156
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	20
NaCl	10
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	4.96

En la tabla 6 se muestran los minerales empleados en la solución de minerales traza, estos se disolvieron de manera secuencial en aproximadamente 800 mL de agua destilada y se ajustó el pH a 6.0 después de cada adición, se aforo a 1000 m, se esterilizo por filtración y se almaceno en refrigeración (4-6 °C).

Tabla 6. Minerales traza para la preparación de 1L de la solución stock.

Mineral	g/1000 mL
$\text{EDTA Na}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	6.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2.2
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.57
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5
H_3BO_3	0.229
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.161
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0.157
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.151

La base de minerales se preparó empleando los volúmenes requeridos de las soluciones stock de minerales y minerales traza (tabla 7) para preparar 1L de solución base de minerales, el pH se ajustó a 6.8 de la solución final (esta solución se preparaba fresca cada vez que se requería preparar el medio).

Tabla 7. Volúmenes requeridos de las soluciones stock de minerales y minerales traza para la preparación de la base de minerales.

Mineral	Volumen (mL)
H ₂ O	900
K ₂ HPO ₄	10.4
KH ₂ PO ₄	9.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	20
MgSO ₄ *7 H ₂ O	20
NaCl	20
CaCl ₂ *6 H ₂ O	20
Minerales traza	6

Mezcla de aminoácidos.

Para la preparación de la mezcla de aminoácidos se pesaron la cantidad de cada aminoácido mostrada en la tabla 8, se disolvieron en agua destilada de manera consecutiva, ajustando el pH a 5-6 con NaOH 4M después de cada adición, aforando la solución final a 1 L y se esterilizó por filtración almacenándose a -20 °C.

Tabla 8. Cantidad de aminoácidos para la preparación de 1L de solución stock

Aminoácido	g/ 1000mL
D-L alanina	5
L-arginina	5
D-L ácido aspártico	5
Ácido L-glutámico	5
L-lisina	1
D-L metionina	1
Glicina	0.5
L-histidina	0.5
L-isoleucina	0.5
L-leucina	0.5
L-fenilalanina	0.5
L-prolina	0.5
L-serina	0.5
L-treonina	0.5
L-triptófano	0.5
L-valina	0.5

Mezcla de Vitaminas

La solución stock de vitaminas se obtuvo mezclando 100 mL de las mezclas I, II y III mostradas en las tablas 9, 10 y 11, respectivamente; se ajustó el pH de la solución final a 5-6 y se aforo a 1 L, la mezcla se esterilizó por filtración y se almacenó a -20 °C.

La mezcla I se obtuvo al disolver de manera consecutiva las cantidades de las vitaminas mostradas en la tabla 9, después de cada adición se ajustó el pH a 5-6 (la riboflavina se disolvía en agua ligeramente caliente).

Tabla 9. Mezcla I de vitaminas

Vitamina	mg/ 100 mL
Riboflavina	50
Acido nicotínico	50
Pantotenato-Ca	50
Tiamina-HCl	50

La mezcla II se obtuvo al disolver de manera consecutiva las cantidades de las vitaminas mostradas en la tabla 10, después de cada adición se ajustó el pH a 5-6 (El ácido fólico se disolvía en agua a temperatura de ebullición).

Tabla 10. Mezcla II de vitaminas

Vitamina	mg/ 100 mL
Ácido fólico	10
Acido p-aminobenzoico	10
Piridoxal-HCl	10

Tabla 11. Mezcla III de vitaminas

Vitamina	mg/ 1000 mL
Biotina	10
Cianocobalamina	10

Tirosina

Se disolvieron 0.5g de tirosina en el volumen mínimo de HCl 3M; posteriormente se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración almacenándose en refrigeración (4-6 °C).

Sulfato de adenina

Se disolvieron 0.1g de adenina en el volumen mínimo de HCl 3M; posteriormente se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración almacenándose en refrigeración (4-6 °C).

Guanina

Se disolvieron 0.1g de guanina en el volumen mínimo de HCl 3M; posteriormente se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración almacenándose en refrigeración (4-6 °C).

Uracilo

Se disolvieron 0.1g de uracilo en el volumen mínimo de HCl 3M; posteriormente se aforó a 100 mL y se esterilizó por filtración almacenándose en refrigeración (4-6 °C).

Cisteína-HCl

Se disolvieron 0.5 g de cisteína en la cantidad mínima de HCl 3M y se aforó a 100 mL con agua destilada, posteriormente se esterilizó por filtración y se almacenó en refrigeración (4-6 °C).

Xantina

Se disolvieron 0.1 g de xantina en 50 mL de agua destilada y suficiente hidróxido de amonio, la solución se aforo a 100 mL, se esterilizo por filtración y se almaceno en refrigeración (4-6 °C).

Composición del medio HSH

En la tabla 12 se muestran los volúmenes necesarios de las soluciones stock para la preparación de 1 litro de medio HSH, la L-histidina se disolvió en la base de minerales y posteriormente se agregaron el agua y el resto de las soluciones de manera aséptica, el carbohidrato se agregó en peso (20 g/L) al final, el medio se esterilizo durante 15 minutos a 121 °C y mantuvo en prueba de esterilidad durante 24 horas a 30 °C.

Tabla 12. Volúmenes de las soluciones Stock para la preparación de 1 L de medio HSH.

Soluciones Stock	Volumen (mL)
Agua	480
Base de Minerales	500
Mezcla de aminoácidos	10
Mezcla de vitaminas	1
Cisteina-HCl	1
Xantina	1
Tirosina	1
Sulfato de adenina	1
Guanina-HCl	1
Uracilo	1
L-histina	3 g
Carbohidrato	20 g

EVALUACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES DE CRECIMIENTO PARA *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO HSH

La evaluación del crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH se realizó en una primera etapa variando la fuente de carbono, empleando 5 carbohidratos diferentes (glucosa, maltosa, sacarosa, fructosa y lactosa). Se determinó si la cepa 115 era capaz de crecer en el medio HSH mediante la presencia o ausencia de turbidez en un matraz con 25 mL de caldo HSH inoculados al 1% v/v e incubados a 30 °C, pH inicial de 6.5 tras 24 horas de fermentación.

La evaluación de las condiciones óptimas de crecimiento se realizó mediante el monitoreo del crecimiento en medio HSH con lactosa y maltosa como fuentes de carbono, ambas fermentaciones se llevaron a cabo en 250 mL de caldo HSH inoculado al 1 % v/v con un cultivo de *L. lactis* cepa 115 reactivado, tal como se describió previamente. Los matraces inoculados se incubaron 24 horas a 30°C con un pH inicial de 6.5 (tabla 13).

Tabla 13. Evaluación de diferentes fuentes de carbono para el crecimiento *L. lactis* cepa 115 realizadas en medio HSH, manteniendo la temperatura de incubación y el pH inicial del medio constante.

Fermentación No.	Fuente de carbono	Temperatura de incubación (°C)	pH inicial del medio
1	Lactosa	30	6.5
2	Maltosa	30	6.5

Para ambas fermentaciones se tomaron muestras a los tiempos 0, 1.5, 3, 4.5, 6, 7.5, 9, 10.5, 12, 24 y 48 horas, se monitoreó la densidad óptica midiendo la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis), el pH (potenciómetro Orion 410A+) y se evaluó el crecimiento mediante el conteo en placa en agar MRS (Camacho *et al.*, 2009), como se describió previamente.

PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR

La prueba de difusión en agar se realizó probando la actividad de las sustancias producidas durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115, frente a cultivos de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua*; como control positivo se empleó el sobrenadante de la cepa 33 (*Streptococcus* spp.) y como control negativo agua destilada estéril.

En placas de agar BHI tamponadas (tabla 14) se colocaron torres de vidrio estériles para la formación de pozos al adicionar la sobrecapa de agar BHI tamponada (tabla 14), la cual se inoculó con 40 µL de un cultivo diluido (10^{-2}) de 6 horas de crecimiento de *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* para obtener un crecimiento uniforme y homogéneo en el agar. Sobre los pozos se depositaron 80 µL de los sobrenadantes de los cultivos (20 mL) que se concentraron en la liofilizadora (Labconco L-313) durante 24 horas y re suspendieron en 2 mL de agua destilada estéril. Las placas con las muestras ya depositadas en los pozos se incubaron 24 horas a 37°C y se registró la presencia o ausencia de un halo de inhibición, así como su diámetro (Tavera, 2010).

Tabla 14. Composición de la capa y sobrecapa tamponadas.

Reactivo	Cantidad (g) para 1000 mL	
	Capa	Sobrecapa
Caldo BHI	37	15
Agar bacteriológico	17	8
Fosfato monobásico de sodio	4.3	4
Fosfato dibásico de sodio	10	10

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA

La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford empleando el kit Quick Start™ Bradford Protein Assay BIORAD. Se realizó una curva de calibración con un rango de 125 – 1000 µg/mL empleando BSA (BIO-RAD) (albumina bovina sérica) como patrón.

La curva se realizó tomando 20 µL de cada estándar de BSA y se agregó 1 mL del reactivo de Bradford se dejó incubar durante 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 595 nm en el espectrofotómetro (Genesys 10S UV-Vis) frente a un blanco (20 µL Agua + Reactivo de Bradford), los datos obtenidos se graficaron y se realizó una regresión lineal.

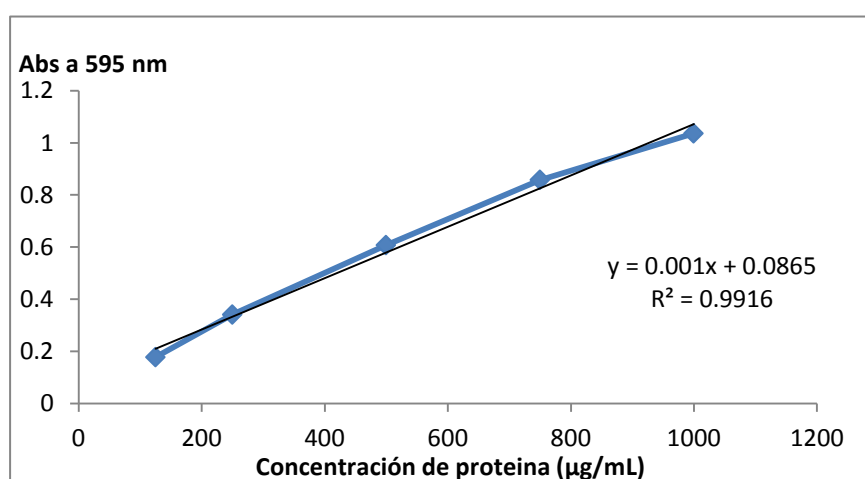


Figura 5. Curva patrón de BSA Método de Bradford.

De igual manera se colocaron 20 µL de las muestras y se agregaron 1 mL del reactivo de Bradford, tras 5 minutos de incubación se determinó la absorbancia a 595 nm y la concentración de proteína en las muestras se calculó empleando la ecuación de la recta obtenida en la regresión lineal de la curva de calibración.

PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR LA METODOLOGIA ADSORCIÓN/DESORCIÓN.

La purificación del compuesto antimicrobiano se llevó a cabo mediante la metodología de adsorción/desorción (Vera, 2007); se inoculó al 1% 100 mL de medio de cultivo (MRS o HSH) a partir de un cultivo de la cepa 115 reactivado y se incubó durante 9 horas a 30 °C, el cultivo obtenido se sometió a un tratamiento térmico a 70 °C durante 30 minutos. Para la adsorción el cultivo se llevó a pH 5.0 con NaOH 10M, manteniéndose en agitación constante durante 18 horas a 4°C, posteriormente, el cultivo se centrifugo a 14000 rpm, a 4°C durante 15 minutos para la obtención del pellet, el cual fue lavado 2 veces con buffer de fosfatos (5 mM y pH 6.5) y posteriormente el pellet se disolvió en una solución de metanol al 30% pH= 1 y se mantuvo en agitación constante a 4 °C durante 18 horas para la desorción. Al transcurrir el tiempo, se centrifugo a 4000 rpm, 4 °C durante 15 minutos y el sobrenadante obtenido se llevó al rotavapor (10 minutos a 65 °C, 20 rpm) para la eliminación del metanol. La muestra libre de metanol se mantuvo en congelación y posteriormente se llevó a la liofilizadora (Labconco L-313).

La muestra liofilizada se re disolvió en 1 mL de agua destilada estéril.

PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO.

La purificación del compuesto antimicrobiano por precipitación con sulfato de amonio (Vera, 2007), se realizó probando un rango de concentración de 45% - 65% de saturación. Se prepararon 250 mL de medio de cultivo (MRS y HSH), se inocularon al 1% y se mantuvieron en incubación a 30 °C tras 9 horas de fermentación y se centrifugaron a 10, 000 rpm a 4°C durante 10 minutos para obtener el sobrenadante libre de células.

El sobrenadante fue colocado en un vaso de precipitado bajo agitación constante en baño de hielo y se agregó lentamente la cantidad necesaria de sulfato de amonio en polvo hasta llegar a la concentración deseada, cuando el sulfato de amonio se encontraba perfectamente disuelto, se tomó una muestra y se centrifugo a 10,000 rpm a 4°C durante 15 minutos, obteniendo el sobrenadante y el pellet, el cual se re disolvió en 1 mL buffer de fosfatos (0.2M,

pH 6.5); los sobrenadantes y pellets correspondientes a cada fracción se guardaron en refrigeración para la posterior diálisis.

La diálisis se realizó colocando 1 mL de las diferentes fracciones obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio (pellets y sobrenadantes) en una membrana de celulosa de 3.5 kDa (Spectra/Por3) y se colocaron en un vaso de precipitado con 1 litro de buffer de fosfatos (0.2M pH 6.5), se mantuvo en agitación constante a 4-6 °C durante 24 horas cambiando el buffer cada 3 horas, las muestras libres de sulfato de amonio se conservaron en congelación.

PRECIPITACIÓN CON TCA

La precipitación con ácido tricloroacético (TCA) se realizó para lograr mayor concentración de las proteínas presentes en las muestras purificadas.

Se agregaron 50 µL de TCA (100 % m/v) a 200 µL de la muestra purificada y se mantuvo en baño de hielo durante 30 minutos, posteriormente se centrifugo a 10,000 rpm a 4°C durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet obtenido se lavó 2 veces con 100 µL de acetona fría, se eliminó la acetona por decantación y se dejó evaporar unos minutos la acetona remanente; por último, el pellet se re disolvió en 30 µL de una disolución urea 8M con 3-[(3-colamidopropil)-dimetilamonio]-propano sulfonato (CHAPS) al 4%.

ELECTROFORESIS

La caracterización de la sustancia antimicrobiana presente en las muestras semi purificadas se realizó mediante una electroforesis SDS-PAGE (Olvera-Garcia, 2015) empleando el equipo Mini-Protean™ Tetra cell, BIO-RAD. La formulación para la preparación de los geles concentrador y separador para el perfil electroforético se muestra en la tabla 15.

Para la electroforesis se tomaron 30 µL de las muestras, se agregaron 10 µL de buffer de carga, se sometieron a un tratamiento térmico (88°C por 8 minutos) y posteriormente se enfriaron en baño de hielo.

En los pozos del gel concentrador se cargaron 30 μ L de las muestras preparadas y 5 μ L de marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ (BIO-RAD), y se corrió a 100 V hasta que el frente de corrida llego al tope inferior (aproximadamente 2 horas), posteriormente el gel se lavó con agua destilada durante 10 minutos, tiñéndose con azul de Coomassie durante 24 horas con agitación, posteriormente el gel se colocó en una solución fijadora de metanol/agua/ácido acético (5:4:1) durante 40 minutos con agitación constante y finalmente se destiño con solución de metanol/agua/ácido acético (5:88:7) realizando cambios de esta hasta obtener el contraste deseado.

Tabla 15. Formulación para los geles SDS-PAGE

Reactivo	Volumen	
	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida(30%)-bis acrilamida(0.8)%	2.08 mL	0.68 mL
Agua	1.59 mL	3.04 mL
Buffer Tris HCl 1.5M, 0.2% SDS, pH= 8.8	1.3 mL	-
Buffer Tris HCl 0.65M, 0.4% SDS, pH = 6.8	-	1.25 mL
PSA (persulfato de amonio)	25 μ L	25 μ L
TEMED	5 μ L	5 μ L

ZIMOGRAMA

Para observar la actividad del compuesto antimicrobiano se realizó un zimograma (Olvera-Garcia, 2015) (tabla 16), para el gel separador del zimograma se emplearon células de *Listeria innocua* provenientes de 100 mL de medio BHI con 12 horas de crecimiento inoculado al 1 % de un cultivo reactivado, centrifugado a 10,000 rpm, 4 °C, 10 minutos, lavadas 2 veces con solución salina estéril y re suspendidas en 1 mL de agua destilada estéril, posteriormente se les dio un tratamiento térmico (80 °C/ 10 minutos).

Los pozos se cargaron con 30 μ L de las muestras preparadas y se dejó correr a 100 V hasta que el frente de corrida llego al tope inferior (aproximadamente 2 horas), el gel se lavó 3 veces con agua destilada durante 10 minutos, y se colocó en una solución amortiguadora (Tris-HCl 100 mM y tritón al 1%, pH 8.0), incubándose durante 24 h a 37 °C y posteriormente tiñéndose con una solución de azul de metileno 0.1%; removiendo el colorante con agua destilada.

Tabla 16. Formulación para el Zimograma.

Reactivo	Volumen	
	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida(30%)-bis acrilamida(0.8)%	2.08 mL	0.68 mL
Agua	1.14 mL	3.04 mL
Buffer Tris HCl 1.5M, 0.2% SDS, pH= 8.8	1.3 mL	-
Buffer Tris HCl 0.65M, 0.4% SDS, pH = 6.8	-	1.25 mL
PSA (persulfato de amonio)	25 µL	25 µL
TEMED	5 µL	5 µL
Células de <i>Listeria innocua</i>	0.45 mL	-

Para la observación de los geles y el manejo de las imágenes se empleó el equipo Chemidoc de BIO-RAD.

SECUENCIACIÓN

Para la secuenciación de la posible bacteriocina, se realizó un gel SDS-PAGE como se describió previamente cargando la muestra obtenida por la metodología de adsorción/desorción, al término de la corrida el gel se tiñó con azul de Coomassie durante 24 horas con agitación constante, posteriormente se colocó en una solución fijadora de metanol/agua/ácido acético (5:4:1) durante 40 minutos con agitación constante y finalmente se destiño con solución de metanol/agua/ácido acético (5:88:7), realizando cambios de esta hasta obtener el contraste deseado y posteriormente se lavó 2 veces durante 10 minutos con agua desionizada estéril. La banda observada en el gel se cortó con ayuda de un bisturí y pinzas nuevas y estériles, la banda cortada se colocó en un micro tubo y se agregaron 100 µL de agua miliQ y se almaceno a -90°C hasta su procesamiento.

La banda se nombró L115 y se envió al instituto de investigaciones clínicas de Montreal (IRC-M) para ser secuenciada, la banda fue digerida con tripsina y posteriormente se sometió a una cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masas en tándem (LC-MS/MS), una vez obtenida la secuencia se realizó una comparación con la base de datos de proteínas bacterianas del NCBI (Centro Nacional para la Información Bioinformática).

RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

VERIFICACIÓN DE PUREZA DE LA CEPA 115

La determinación de la viabilidad y pureza de la cepa 115 se realizó como se describió previamente. En las placas de agar MRS se desarrollaron colonias uniformes y homogéneas, pequeñas, circulares, de color crema, convexas y lechosas (Figura 6), la tinción de Gram mostró cocos de color morado (Gram positivos), sin agrupación definida.



Figura 6. Colonias de *Lactococcus lactis* cepa 115 en agar MRS incubadas durante 24 horas a 30 °C.

Las colonias desarrolladas en las placas son características de las bacterias ácido lácticas (Kumar y Kumar, 2014), mientras que la morfología y agrupación de las células observadas al microscopio son características de los miembros del género *Lactococcus*. La homogeneidad de las colonias desarrolladas así como solo observar únicamente cocos Gram positivos son indicativos de que el cultivo de la cepa 115 se encontraba viable y puro, por lo que se conservó en congelación.

VERIFICACIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

En trabajos previos (Maldonado, 2016) dentro del grupo de trabajo se observó que *Lactococcus lactis* cepa 115 aislado del atole agrio presentaba actividad inhibitoria frente a *Listeria monocytogenes*. Para la verificación de la actividad antimicrobiana de la cepa 115 se realizó la prueba de difusión en agar.

En la Tabla 17 se muestran los diámetros de los halos de inhibición obtenidos durante la prueba de difusión en agar, se empleó a *Streptococcus* spp. cepa 33 como control positivo (Maldonado, 2016) y agua destilada estéril como control negativo. La cepa 115, si presentó actividad antimicrobiana al observarse halos de inhibición transparentes frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* pero de menor tamaño en comparación con la cepa 33. La presencia de halos de inhibición se atribuye a sustancias de carácter proteico como bacteriocinas y PGH debido a que se emplea un medio amortiguado, por lo cual no hay acción de los ácidos orgánicos producidos durante la fermentación de la glucosa.

Tabla 17. Halos de inhibición promedio (desviación estándar) frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua*, obtenidos en la prueba de difusión en agar por los sobrenadantes de un cultivo de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS incubados a 30 °C durante 24 horas.

Muestra	Halo de inhibición (mm)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
Agua destilada estéril (-)	0.0	0.0
Cepa 33 (+)	27(0.00)	16.4(0.00)
Cepa 115	11 (0.71)	11 (0.00)

Debido a que los halos obtenidos por los sobrenadantes de la cepa 115 son muy pequeños en comparación con otros halos producidos por BAL como las cepas 33 y A45212 (Mellado, 2018), se ensayó crecer a la cepa 115 en medio MRS variando la fuente de carbono para determinar si alguno de los carbohidratos a ensayar aumentaba la producción de la sustancia con actividad antimicrobiana ya que la fuente de carbono es uno de los principales factores que afectan directamente la producción de sustancias de interés en BAL (Mataragas, 2003), así como liofilizar los sobrenadantes para lograr una concentración de la sustancia con actividad antimicrobiana esperando observar un aumento en el diámetro de los halos de inhibición. La cepa 115 fue capaz de crecer en el medio MRS variando la fuente de carbono: sacarosa, maltosa, fructosa y lactosa, además de glucosa; *Lactococcus lactis* fue capaz de fermentar los 5 carbohidratos ensayados empleándolos como fuente de carbono para la obtención de energía (Terence, 1980), así como de producir la sustancia con actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Listeria* (Tabla 18).

Tabla 18. Halos de inhibición obtenidos frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* en la prueba de difusión en agar de los sobrenadantes liofilizados de cultivos de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS variando el carbohidrato (fuente de carbono), incubados a 30 °C durante 24 horas.

Fuente de Carbono	Halo de Inhibición (mm)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
Glucosa	12.5 (0.70)	12.5 (0.70)
Sacarosa	10 (0.00)	10 (0.00)
Maltosa	10 (0.71)	10 (0.00)
Fructosa	<10 (0.07)	10 (0.00)
Lactosa	11 (0.00)	11 (0.00)

En la tabla 18 se muestran los halos obtenidos por las muestras liofilizadas variando el carbohidrato como fuente de carbono, la muestra con glucosa como fuente de carbono fue la que presentó el mayor halo de inhibición de las 5 muestras ensayadas e incluso siendo ligeramente mayor al halo producido por la muestra con glucosa sin liofilizar (Tabla 16). La liofilización de muestras con bacteriocinas es eficiente para su almacenamiento, debido a la concentración de las bacteriocinas al eliminar el agua presente en las muestras ocurre un aumento en la actividad de las muestras liofilizadas, dichas muestras son estables a largos tiempos y temperaturas de almacenamiento (Pingitore *et al*, 2012; Dimitrieva-Moats *et al*, 2012). Las muestras con sacarosa, maltosa, fructosa y lactosa si causaron halos de inhibición, sin embargo, no fueron mayores al de la glucosa, que es el carbohidrato originalmente presente en el medio MRS.

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO MRS

Para determinar las mejores condiciones de pH y temperatura para el crecimiento de la cepa 115, se decidió emplear medio MRS con glucosa como fuente carbono al obtener los mejores resultados en la producción de la sustancia con actividad frente a las cepas de *Listeria* (Tabla 18).

Evaluación de la temperatura de incubación óptima

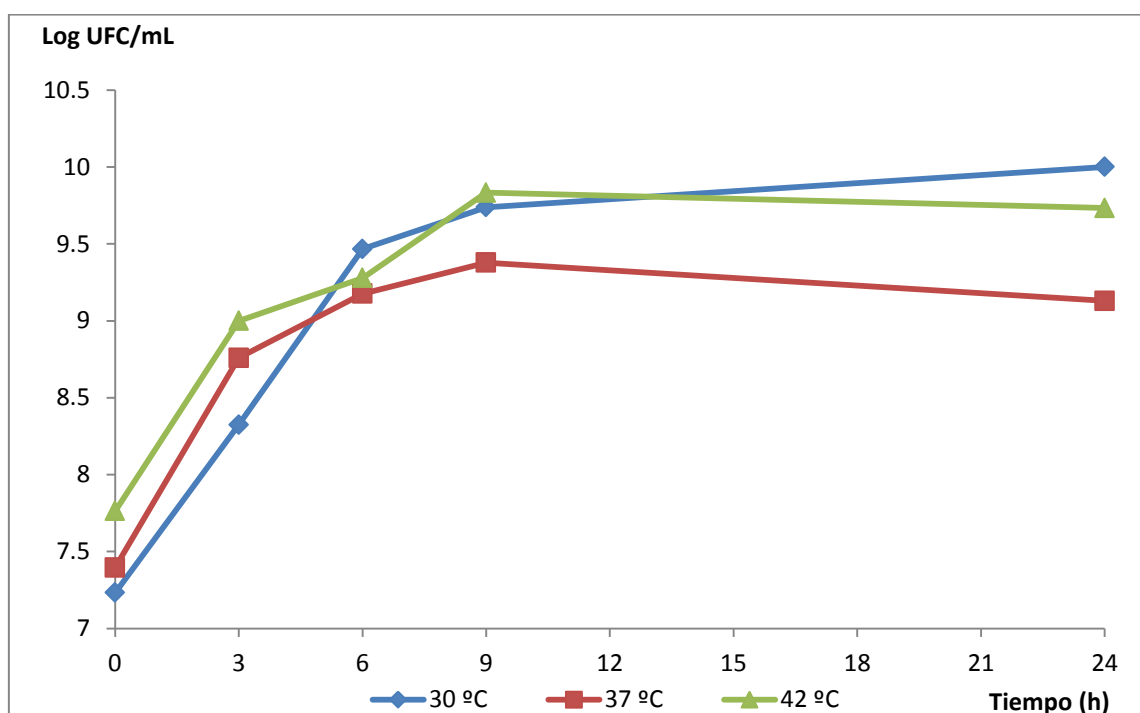


Figura 7. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS manteniendo el pH inicial constante (6.5).

La evaluación de la temperatura óptima de crecimiento se realizó variando la temperatura de incubación: 30, 37 y 42 °C y manteniendo el pH inicial del medio constante (6.5) midiendo la absorbancia a 600nm, el descenso del pH y cuantificando el crecimiento en placa.

En la figura 7 se muestra la curva de crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 graficando los valores de log UFC/mL con respecto al tiempo, para todas las fermentaciones se observa que la fase exponencial de la cepa comienza a las 1.5 horas y se prolonga hasta las 9 horas. A partir de ese momento

comenzó la zona de crecimiento estacionario, misma que se extendió hasta las 24 horas.

En el gráfico se observó una tendencia; al aumentar la temperatura de incubación hubo un aumento en el crecimiento en las primeras horas de la fermentación, esta tendencia se observó comparando los valores obtenidos de las cuentas microbianas de las fermentaciones incubadas a 37 y 42 °C con respecto a la fermentación incubada a 30 °C; este efecto se puede asociar al aumento en el crecimiento por el incremento en la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas (Martínez *et al.*, 2009). Sin embargo, después de aproximadamente las 6 horas, los valores de UFC/mL disminuyeron en las fermentaciones incubadas a 37 y 42 °C, mientras que los de la fermentación incubada a 30 °C presentaron un ligero aumento que continuó hasta el término de la fermentación. La disminución en cuanto al crecimiento a temperaturas más altas puede deberse a que en principio ocurre un rápido crecimiento debido a un metabolismo más activo por el aumento en las reacciones enzimáticas que se ven favorecidas por el aumento en la temperatura (Montville, 2000), pero esto conlleva a una mayor producción de ácido láctico derivado del metabolismo de la glucosa del medio lo cual acidifica más rápidamente generando un medio ácido no muy favorable para *Lactococcus lactis* (Terence, 1968). La mayoría de los miembros del género *Lactococcus* presentan una temperatura de crecimiento óptima de 30 °C (Batt, 1999) así como varias especies de BAL (Khalil *et al.*, 2009), y para el caso de otras BAL productoras de bacteriocinas se han reportado temperaturas óptimas de crecimiento de 30 °C para *Leuconostoc mesenteroides* L124 y *Lactobacillus curvatus* L442 (Mataragas *et al.*, 2002), mientras que otras presentan temperaturas de crecimiento óptimas ligeramente más altas como *Streptococcus* spp., la cual presenta una temperatura óptima de crecimiento de 37 °C (Lara, 2018). Para cada bacteria se presenta una temperatura óptima de crecimiento que está relacionada con la cepa, la genética y el ambiente del cual ha sido aislada (Ratwosky *et al.*, 1982).

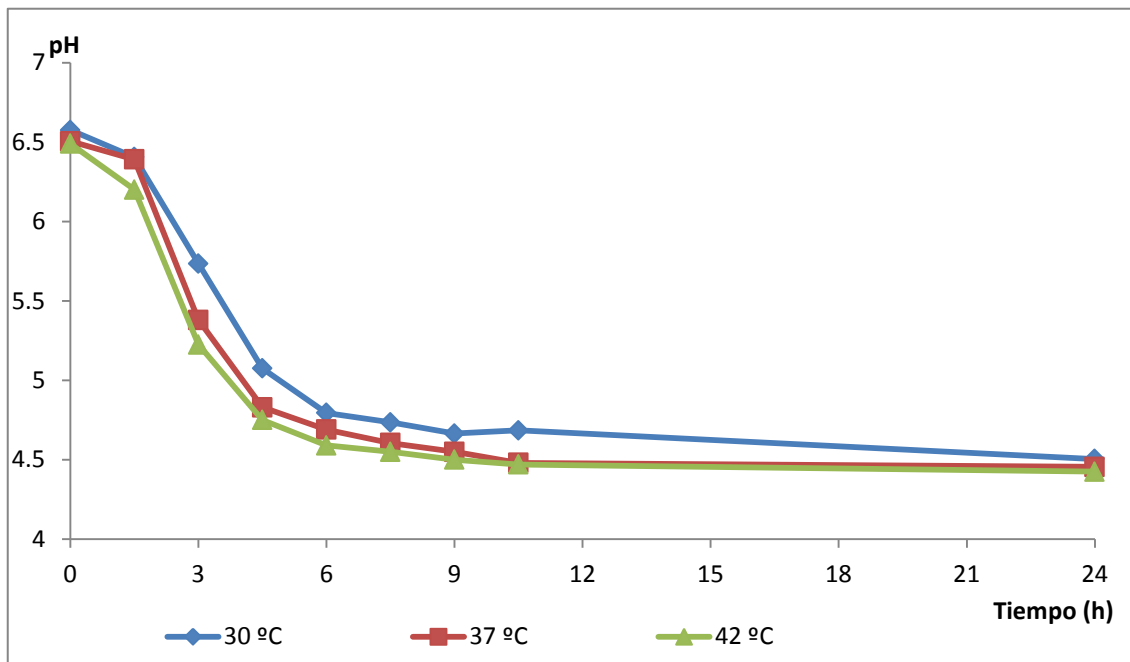


Figura 8. Curva de disminución del pH inicial durante la evaluación de las condiciones de temperatura para el crecimiento en medio MRS de *Lactococcus lactis* cepa 115 manteniendo el pH inicial constante (6.5).

Durante la fermentación, el valor de pH del medio disminuye debido al metabolismo fermentativo de la glucosa presente en el medio por acción de la cepa 115. En la figura 8 se muestra la curva de descenso del pH con respecto al tiempo para los 3 diferentes tratamientos, donde el descenso más marcado se presentó en la fermentación con una temperatura de 42 °C, seguida de la fermentación a 37°C, siendo más lenta la caída del pH en la fermentación incubada a 30°C, coincidiendo con la tendencia observada en el crecimiento de la cepa 115 en la cual a temperaturas más altas se presenta un aumento en el crecimiento en las primeras etapas de la fermentación. Sin embargo, todas las fermentaciones terminaron con un pH similar aproximadamente 4.5 después de 24 horas de incubación.

Evaluación del pH inicial óptimo de crecimiento

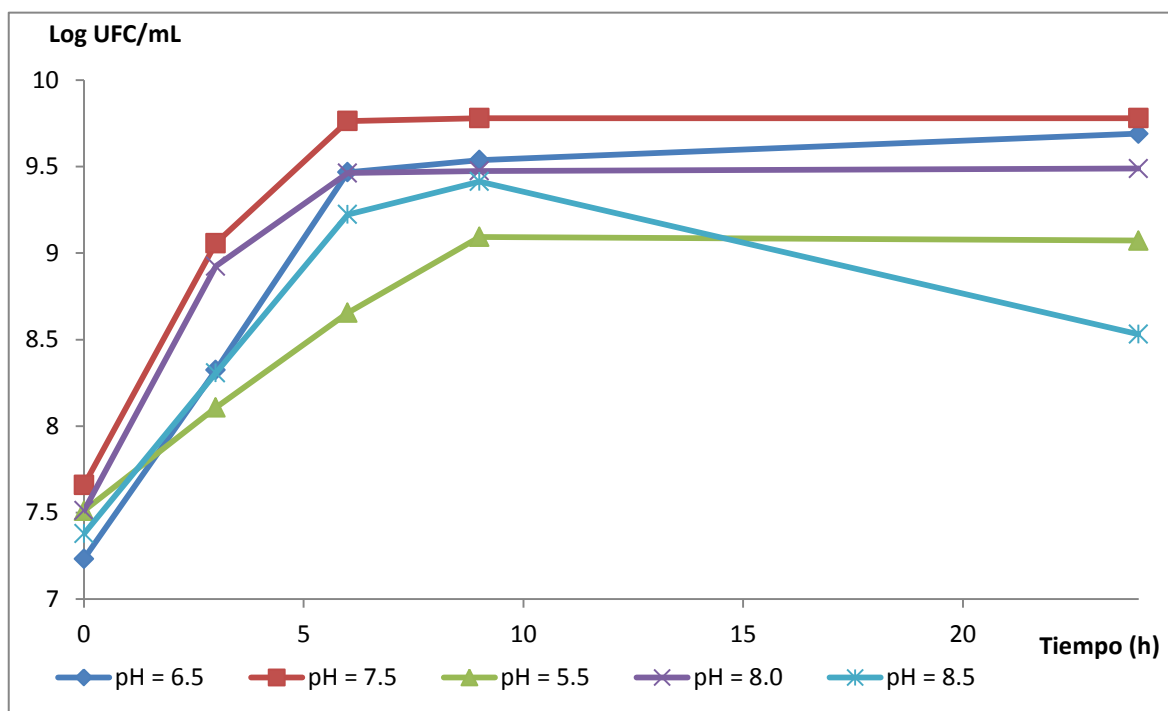


Figura 9. Evaluación del efecto del pH inicial del medio MRS sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 manteniendo la temperatura constante (30 °C) (Cuenta en placa, valores de log UFC/mL).

La evaluación del pH óptimo de crecimiento para *Lactococcus lactis* cepa 115 se realizó probando diferentes valores de pH iniciales (5.5, 6.5, 7.5, 8.0 y 8.5), manteniendo constante la temperatura de incubación (30 °C). La figura 9 muestra la curva de crecimiento graficando los valores de log UFC/mL con respecto al tiempo. En la figura se observa que los datos de UFC/mL para la fermentación con un pH inicial de 5.5 fueron los más bajos entre los 5 tratamientos probados, lo que indicó un bajo crecimiento y mayor sensibilidad a valores bajos de pH por parte de la cepa 115.

En la fermentación con un pH inicial de 8.5 se obtuvieron cuentas bajas e incluso se observó una disminución en la cuenta microbiana en el tiempo 24 horas lo que sugiere que a este valor de pH fue condición límite para su crecimiento, a diferencia de otras BAL aisladas de otros alimentos fermentados tradicionales como algunas cepas del género *Streptococcus* aisladas de pozol, las cuales crecen bien en medios con un pH inicial de 8.5 (López, 2005).

La fermentación con un pH inicial de 7.5 presentó los más altos valores de cuenta en placa, lo que indicó un mejor crecimiento en esas condiciones de pH. En trabajos previos se ha observado que un pH ligeramente alcalino (7.5) favorece el crecimiento de bacterias ácido lácticas del género *Streptococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales (Lara, 2018), al igual que otras BAL como *Enterococcus mundtii* tw56 la cual presentó un mayor crecimiento a pH 6.5-6.8 en comparación con pH más bajos 5-5.5 (Vallejo *et al*, 2014) y cuatro especies de BAL aisladas de productos fermentados (*Enterococcus faecium* JTR-1, *Lactobacillus paracasei* JFR-5, *Streptococcus thermophilus* TSB-8 y *Lactobacillus curvatus* Arla-10) las cuales presentaron el mayor crecimiento a valores de pH inicial del medio de 7.4 (Yang *et al.*, 2018).

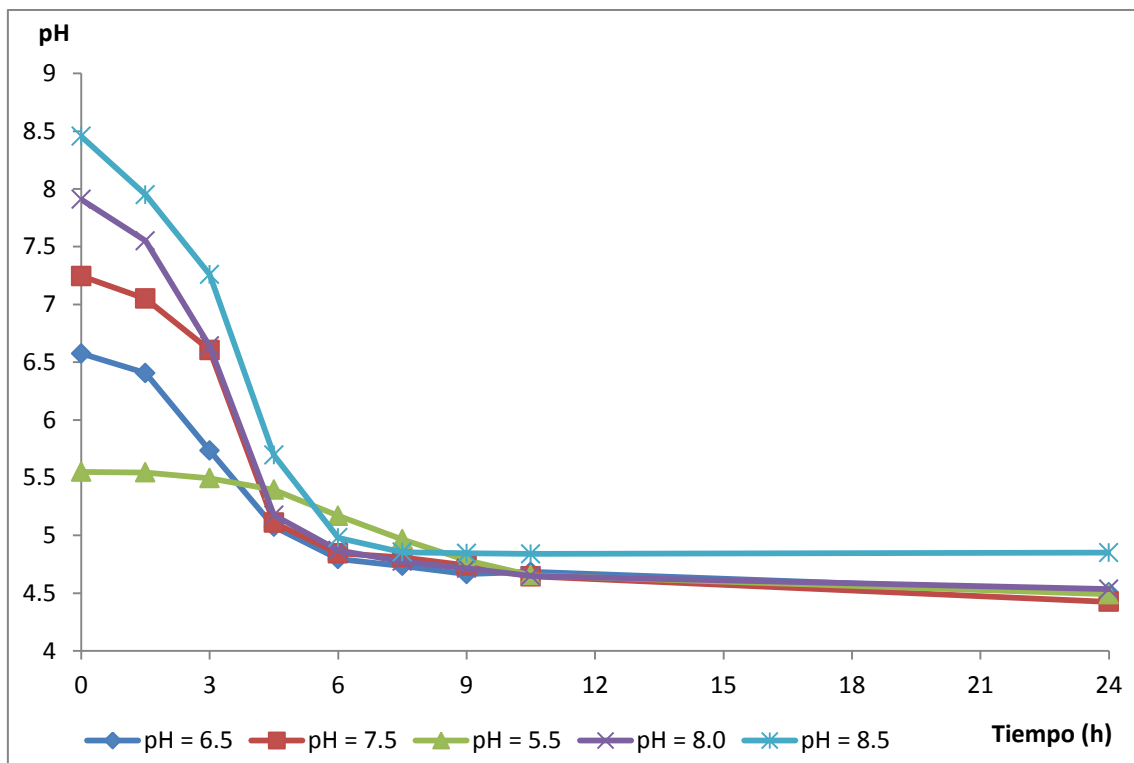


Figura 10. Curva de disminución del pH inicial del medio MRS durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en la evaluación de las mejores condiciones de pH inicial, manteniendo la temperatura de incubación constante (30 °C).

La figura 10 muestra las curvas de descenso de pH para los 5 tratamientos donde se varió el pH inicial, todas las fermentaciones presentaron un descenso en el valor de pH inicial hasta un valor aproximado de 4.5, exceptuando la fermentación con el pH inicial de 8.5, la cual presentó un pH final de 4.8, mientras que en la fermentación con un pH inicial de 5.5 el descenso del valor del pH no fue muy marcado coincidiendo con el bajo crecimiento de la cepa 115 bajo estas condiciones.

La condición óptima de temperatura donde se observó un mayor crecimiento fue en la fermentación incubada a 30°C al presentar los valores más altos tanto de densidad óptica como del conteo en placa durante la mayor parte de la fermentación, mientras que la fermentación con un pH inicial de 7.5 presentó el mejor crecimiento dentro de los tratamientos en los cuales se varió el pH inicial, siendo estas dos condiciones las que producen un mayor crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115.

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA POR *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO MRS.

La mayoría de las bacteriocinas estudiadas se consideran metabolitos primarios por lo cual su producción está en función del aumento de la biomasa (De Vuyst *et al.*, 1996; Baker, 1996). Para muchas bacteriocinas la temperatura en la que ocurre una mayor producción coincide con la temperatura óptima de crecimiento de la cepa productora (Mataragas, 2003; Trinetta *et al.*, 2008; De Vuyst, 1996); sin embargo, para otras la mayor producción ocurre a temperaturas ligeramente menores a la temperatura óptima de crecimiento (Yang *et al.*, 2018; Delgado *et al.*, 2005), mientras que a temperaturas más altas la producción de las bacteriocinas disminuye al ser este un proceso sensible a la temperatura (Leroy y De Vuyst, 1999).

Tabla 19. Halos de inhibición promedio (desviación estándar) frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* en la prueba de difusión en agar utilizando los sobrenadantes liofilizados obtenidos durante las fermentaciones en medio MRS con un pH inicial de 6.5 y variando la temperatura.

Tiempo	Halo de inhibición (mm)					
	<i>Listeria monocytogenes</i>			<i>Listeria innocua</i>		
	30 °C	37 °C	42 °C	30 °C	37 °C	42 °C
9 horas	11.7(0.3)	10.5 (0.7)	11 (0.0)	13.5(0.7)	11.7(0.3)	10 (0.0)
24 horas	12 (0.0)	11.7(0.35)	11.5(0.0)	12 (0.0)	12(0.0)	10 (0.0)

En la Tabla 19 se muestran los halos de inhibición obtenidos durante el ensayo de actividad antimicrobiana probando las muestras obtenidas de los tratamientos en los cuales se varió la temperatura. Las muestras obtenidas durante la fermentación que se incubó a 30 °C mostraron los halos más grandes en comparación con los otros dos tratamientos para ambas etapas de la fermentación probadas (9 y 24 horas). Los tratamientos con temperaturas más altas a la óptima de crecimiento no mostraron un aumento en la producción del compuesto antimicrobiano. La mayor actividad de la nisina producida por *L. lactis* PI-2 ocurre en los medios incubados a 25-30°C y disminuye en aproximadamente un 67 % a 33-37°C (Sadiq *et al.*, 2014) y la bacteriocina producida por *L. lactis* CECT-4434 presenta la menor actividad inhibitoria en los cultivos incubados a 40 °C (Souza *et al.*, 2016).

Tabla 20. Halos de inhibición promedio (DE) frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* obtenidos en la prueba de difusión en agar utilizando los sobrenadantes liofilizados obtenidos durante las fermentaciones en medio MRS variando el pH inicial del medio y manteniendo constante la temperatura de incubación (30°C).

Tiempo	Halo de inhibición (mm)									
	<i>Listeria monocytogenes</i>					<i>Listeria innocua</i>				
	5.5	6.5	7.5	8.0	8.5	5.5	6.5	7.5	8.0	8.5
9 horas	10 (0.0)	11.7 (0.35)	12 (0.0)	11 (0.0)	10.5 (0.7)	10.5 (0.7)	13.5 (0.7)	13 (0.0)	12 (0.0)	11 (0.0)
24 horas	-	12 (0.00)	12 (0.0)	10 (0.0)	11 (0.0)	-	12 (0.0)	12 (0.0)	11.7 (0.35)	11 (0.0)

La tabla 20 muestra los halos de inhibición obtenidos en la prueba de actividad antimicrobiana para las fermentaciones donde se varió el pH inicial del medio, los pH ácidos mostraron un bajo crecimiento de la cepa 115 y las muestras obtenidas durante la fermentación con un pH inicial de 5.5 presentaron los halos de inhibición más pequeños de entre todas las muestras probadas e incluso no se observó la presencia de halo de inhibición en la muestra de 24 horas, esto puede deberse a un fenómeno observado en el cual a valores de pH bajos (3, 4-6) hay una adsorción de las bacteriocinas producidas por las BAL sobre la pared de las células (Mataragas *et al.*, 2002), por lo cual hay una disminución en la actividad inhibitoria de la sustancia antimicrobiana que junto al bajo crecimiento observado en estas condiciones se produce una menor cantidad del compuesto antimicrobiano y menor actividad, dando como resultado la nula aparición de halos de inhibición para dichas muestras.

Los pH alcalinos mostraron ser óptimos para el crecimiento de la cepa 115 y se obtuvieron halos de inhibición más grandes en comparación con los mostrados por las muestras con un pH inicial ácido; se ha observado que caídas más altas de pH (diferencia entre el pH inicial y el pH final) favorecen la producción de algunas bacteriocinas como es el caso de la nisina (Guerra y Pastrana, 2003), bacteriocina producida por *Lactococcus lactis*.

El tratamiento con un pH inicial de 7.5 mostró los halos de inhibición más grandes entre los 5 tratamientos sin haber una gran diferencia entre las muestras de 9 y 24 horas de fermentación.

Tabla 21. Concentración promedio de proteína (DE) presente en los sobrenadantes liofilizados obtenidos durante todas las fermentaciones en medio MRS de la cepa *L. lactis* 115, método de Bradford.

Tiempo	Concentración de proteína (µg/mL)						
	30 °C, pH= 6.5	37 °C pH= 6.5	42 °C pH= 6.5	30 °C, pH =5.5	30 °C, pH =7.5	30 °C, pH = 8	30 °C, pH = 8.5
9 horas	136.3 (12.7)	126.4 (2.68)	134.8 (1.25)	114.7 (8.48)	188.3 (0.21)	176.8 (7.21)	164.0 (0.91)
24 horas	158.2 (8.48)	136.7 (7.6)	134.9 (0.78)	94.9 (4.24)	202.3 (1.69)	162.2 (11.3)	156.1 (2.12)

De manera general, en los tratamientos donde se varió la temperatura de incubación, las muestras de 24 horas tuvieron una mayor concentración de proteína en comparación con las muestras de 9 horas, a diferencia de las muestras donde se varió el pH inicial, donde únicamente se observó esa tendencia en la fermentación con un pH inicial de 7.5, ya que para los otros tratamientos ocurre el caso contrario, al detectarse una disminución en la concentración de proteína total. El aumento observado en la concentración de proteína al transcurrir el tiempo de fermentación se debe a un metabolismo más rápido de la cepa 115 por el posible aumento de las reacciones enzimáticas generando una mayor síntesis de compuestos de carácter proteico (proteínas y péptidos), mientras que la disminución de la cantidad de proteína se puede atribuir al caso contrario, una menor síntesis de compuestos proteicos por un crecimiento más lento así como la adsorción de péptidos catiónicos a las paredes celulares por el pH del medio (Mataragas *et al.*, 2002), lo que genera que dichos compuestos no sean cuantificados por el método de Bradford.

Para los diferentes tratamientos donde se varió la temperatura; la fermentación con una temperatura de incubación de 30 ° C mostró los valores más altos de proteína total mientras que en los cuales se varió el pH inicial, la fermentación con un pH inicial de 7.5 fue el tratamiento en el que se determinó la mayor concentración de proteína de todos los tratamientos evaluados. En las condiciones óptimas de temperatura y pH, el crecimiento es mayor debido al aumento en las reacciones enzimáticas (Martínez *et al.*, 2009), lo que deriva en

un aumento en la velocidad de producción de metabolitos y dentro de ellos se encuentran las sustancias de origen proteico como bacteriocinas y enzimas, las cuales aumentan la concentración de proteína presente en las muestras.

Con ambos resultados (halos de inhibición y concentración de proteína), se muestra que las mejores condiciones de crecimiento en medio MRS para *Lactococcus lactis* cepa 115 coinciden con las mejores condiciones de producción de la sustancia antimicrobiana producida por dicho microorganismo, estas condiciones son: temperatura de incubación de 30 ° C y pH inicial de 7.5. La elección de la etapa de la fermentación donde se produce la mayor cantidad del compuesto antimicrobiano se determinó comparando los valores de concentración de proteína y los halos de inhibición; a las 9 horas se muestra una menor concentración de proteína en comparación con la muestra de las 24 horas, sin embargo al emplear una metodología que mide proteína total y no específicamente la sustancia antimicrobiana de interés y ya que en la prueba de difusión en agar para el tratamiento con las condiciones óptimas no hay una gran diferencia entre las muestras de 9 y 24 horas en los halos de inhibición se eligió el tiempo 9 como la hora de mayor producción de la sustancia antimicrobiana, ya que dicha hora coincide con el principio de la fase estacionaria y se ha observado que la mayor producción de bacteriocinas por algunas BAL se encuentra a la mitad o final de la zona de crecimiento exponencial o al comienzo de la fase estacionaria (De Vuyst *et al.*, 1996).

PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La purificación del compuesto producido por la cepa 115 se realizó por 2 metodologías diferentes; el método de adsorción/desorción y la precipitación fraccionada con sulfato de amonio.

ADSORCIÓN-DESORCIÓN

Para llevar a cabo la purificación por la metodología de adsorción/desorción se realizó una fermentación en las óptimas condiciones de producción del compuesto antimicrobiano en medio MRS (pH inicial: 7.5, temperatura de incubación: 30 °C y 9 horas de fermentación).

Se realizó la prueba de difusión en agar (figura 11) y se determinó la concentración de proteína en la muestra ya purificada para determinar si la sustancia de interés aún seguía presente y no se había perdido en alguna de las etapas de la metodología. En la tabla 22 se muestran los diámetros de los halos de inhibición, así como la concentración de proteína de la muestra. Debido a la actividad inhibitoria observada frente a las cepas de *Listeria* y a la presencia de proteína en la muestra obtenida por la metodología de adsorción/desorción, se considera que dicha metodología es capaz de conservar a la sustancia de carácter proteico y aún mantiene su actividad antimicrobiana.



Figura 11. Halos de inhibición producidos por la muestra purificada por el método de adsorción-desorción en medio MRS frente a *Listeria innocua* (izquierda) y *Listeria monocytogenes* (derecha), control positivo: clorhexidina.

Tabla 22. Halos de inhibición promedio (DE) frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* y concentración de proteína (DE) obtenido de la muestra semipurificada por la metodología de adsorción-desorción.

Halo de Inhibición (mm)		Concentración de proteína (µg/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	572.5 (0.60)
11 (0.0)	11 (0.0)	

PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Para llevar a cabo la precipitación se realizó una fermentación bajo las condiciones óptimas de producción del compuesto antimicrobiano en el medio MRS (pH inicial de 7.5, temperatura de incubación de 30 °C y 9 horas de fermentación). Y se probó un rango de concentración de 45 a 65 % de saturación debido a que en estudios previos dentro del mismo grupo de trabajo (Lara, 2018; Mellado 2019) se trabajó con este rango de concentraciones logrando precipitar y concentrar las proteínas con actividad antimicrobiana producidas por BAL.

Se obtuvieron 2 muestras (sobrenadante y precipitado) de las 5 fracciones correspondientes a las 5 concentraciones de saturación empleadas, pero solo se observó precipitado visible en las fracciones con 45, 50 y 55% de saturación. Las muestras se dializaron durante 24 horas para la eliminación del sulfato de amonio presente en las muestras y así evitar su interferencia en los métodos de purificación y las determinaciones posteriores (Berg *et al.*, 2008).

Se determinó la concentración de proteína en todas las fracciones obtenidas (tabla 23), donde se observa que hay proteína en todas ellas, sin embargo, la mayor cantidad de proteína se encuentra en el precipitado con 45% de saturación, lo que podría indicar que la sustancia de interés se encuentra en dicha fracción. La presencia de proteína en las diferentes fracciones puede deberse a la gran cantidad de proteína en el medio MRS (Carolissen-Mackay *et al.*, 1997), así como otras sustancias proteicas producidas por la cepa 115 durante su crecimiento (oligopeptidos, péptidos y proteínas) que al presentar tamaños y propiedades diferentes quedaron solubles en los sobrenadantes o inclusive precipitaron en las fracciones con 60 y 65% de saturación.

Tabla 23. Concentración promedio de proteína (DE) presente en las diferentes fracciones dializadas obtenidas durante la precipitación con sulfato de amonio. Fermentación en medio MRS de la cepa *L. lactis* 115.

Concentración de proteína ((µg/mL)									
S45	P45	S50	P50	S55	P55	S60	P60	S65	P65
<125 (0.0)	856.5 (45.5)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)

Para verificar la presencia de la sustancia con actividad antimicrobiana en alguna de las fracciones obtenidas se realizó la prueba de difusión en agar, en la tabla 24 se presentan los halos de inhibición obtenidos durante la prueba, solo se observan halos de inhibición en 2 muestras (precipitado de 45 y 50% de saturación). No se observó actividad inhibitoria en los sobrenadantes al igual que en los últimos 3 precipitados (55, 60 y 65% de saturación) y aun cuando hay proteína en dichas fracciones, no se trata de la proteína con actividad antimicrobiana de interés.

Tabla 24. Halos de inhibición promedio (DE) frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* obtenido de las diferentes fracciones obtenidas por la metodología de precipitación con sulfato de amonio.

Fracción	Halo de Inhibición (mm)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
Sobrenadante 45%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 45%	13.0 (0.0)	13.0 (0.0)
Sobrenadante 50%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 50%	10.0 (0.14)	10.0 (0.14)
Sobrenadante 55%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 55%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Sobrenadante 60%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 60%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Sobrenadante 65%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 65%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)

La muestra con el precipitado de 45% de saturación presentó el halo de mayor tamaño y la mayor concentración de proteína de todas las muestras (tablas 23 y 24), lo que indica que la mayoría del compuesto con actividad antimicrobiana precipito en ese porcentaje de saturación, manteniendo su actividad inhibitoria.

La muestra con el precipitado de 50 aun presentó una ligera actividad antimicrobiana, generando un halo de inhibición muy pequeño, esto puede deberse a que parte del compuesto no fue completamente precipitado en la saturación al 45% y precipitó posteriormente en la saturación al 50%.

El rango óptimo para la precipitación de la proteína con actividad antimicrobiana se encuentra entre 40-55%, siendo el 40% la concentración de saturación donde se obtiene la muestra con la mayor cantidad de la sustancia de interés y actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua*.

Tabla 25. Tabla de purificación de la sustancia de origen proteico producida por *L. lactis* cepa 115 con actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* en medio MRS, comparando las muestras obtenidas por el método adsorción/desorción (A/D) y el precipitado de 45 % saturación con sulfato de amonio (P45).

Fracción	Proteína total (µg)	Actividad antimicrobiana (mm de inhibición)	Actividad antimicrobiana específica (mm de inhibición / µg proteína)	Rendimiento	Grado de purificación
Sobrenadante	37660	12	0.0003	100 %	1
Muestra P45	856.5	13	0.0151	108 %	50
Muestra A/D	572.5	12	0.0209	100 %	69

En la tabla 25 se muestra una tabla de purificación comparando las 2 metodologías de purificación del compuesto antimicrobiano (posible bacteriocina) producido por la cepa 115. La concentración de proteína de las muestras purificadas aumenta debido a la concentración de la sustancia antimicrobiana de interés (de carácter proteico, posible bacteriocina) eliminando la proteína contaminante presente en la muestra original, disminuyendo así la cantidad de proteína en las muestras parcialmente purificadas.

La actividad específica de las fracciones purificadas (cociente entre la actividad generada por la muestra entre la cantidad de proteína presente en la muestra) es mayor comparándola con la actividad específica de la muestra original debido a que si bien la actividad inhibitoria puede mantenerse o disminuir, al concentrar la proteína de interés el cociente aumenta.

La actividad específica de la muestra obtenida por la metodología de adsorción/desorción es mayor a la que presenta el precipitado con 45% saturación (fracción seleccionada de entre todas las obtenidas por la precipitación con sulfato de amonio debido a que fue la que presento la mayor actividad inhibitoria y cantidad de proteína) y el grado de purificación de la sustancia de interés también es mayor debido a que la metodología de adsorción/desorción fue específicamente desarrollada para la purificación de bacteriocinas mientras que la precipitación con sulfato de amonio es un método general para el fraccionamiento de proteínas y se requieren de más etapas de purificación para obtener mejores resultados (Berg *et al.*, 2002).

CARACTERIZACIÓN

PERFIL PROTÉICO

La electroforesis SDS-PAGE se realizó empleando la metodología descrita anteriormente, las muestras purificadas fueron precipitadas con TCA antes de su preparación para ser cargadas en el gel, para obtener una mayor concentración de las proteínas presentes en la muestra obteniendo una mejor visualización.

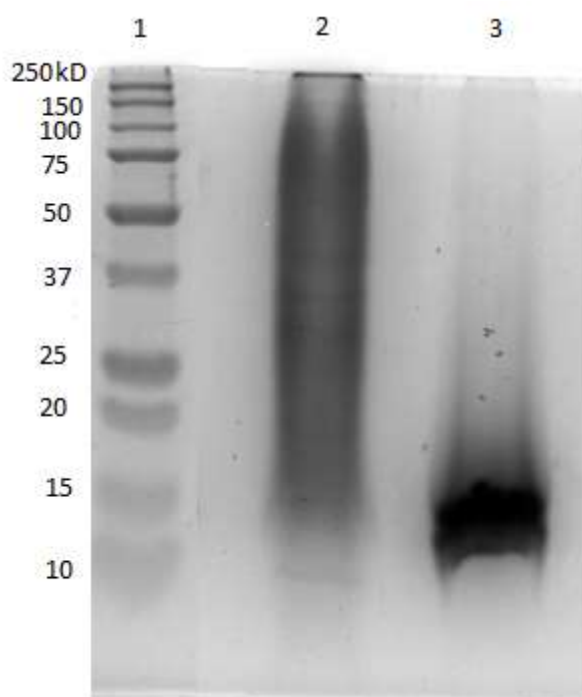


Figura 12. Gel SDS-PAGE (12.5% T) carril 1: marcador de peso molecular All Blue Precision plus protein standards BIORAD; carril 2: muestra precipitada con sulfato de amonio (precipitado de 45% saturación); carril 3: muestra obtenida por la técnica de adsorción/desorción.

En la figura 12 se observa el perfil electroforético obtenido, en el carril 2 se cargó el precipitado de 45% (P45 muestra obtenida por la precipitación con sulfato de amonio), debido a que dicha fracción fue la que genero el mayor halo de inhibición en la prueba de difusión en agar indicando que la proteína de interés se encontraba en dicha fracción, en el gel no se observan bandas definidas si no un barrido que se extiende desde la parte superior del gel hasta aproximadamente una distancia a la altura de entre los 15-10 kDa en el gel.

El barrido se puede atribuir a la gran cantidad de proteína que hay en la muestra, el arrastre de componentes del medio (Segundo, 2017), al igual que la formación de compuestos coloridos ocurridos durante la esterilización del medio MRS, el cual al presentar glucosa, un carbohidrato reductor y aminoácidos provenientes de la proteína del medio, así como un pH óptimo (7.5) se llevan a cabo reacciones de Maillard (Fennema, 2010), generando estos compuestos coloridos que pueden estar ligados a las proteínas formando complejos con ellas e impidiendo una óptima separación en el gel.

En el carril número 3 se cargó la muestra obtenida por la metodología de adsorción y desorción, donde se observa una banda intensa entre 15 y 10 kDa lo que indicaría que la sustancia antimicrobiana probablemente presente un peso molecular dentro de este rango. Sin embargo, la banda observada es muy ancha e intensa para asegurar que se trata de una sola proteína, ya que puede tratarse de dos o más proteínas con pesos moleculares muy cercanos o ser una única banda y la intensidad deberse a la gran concentración de proteína en la muestra. Aun así, la metodología de adsorción y desorción eliminó a las proteínas de alto peso molecular presentes en el medio logrando concentrar únicamente las de bajo peso molecular, dentro de las cuales se presume se encuentre la sustancia proteica con actividad antimicrobiana producida por la cepa 115, posible bacteriocina, debido al bajo peso molecular que estas presentan (Alvarez, 2008).

En el gel SDS-PAGE no se pudo observar una única banda para poder estimar el peso molecular de la sustancia de origen proteico presente en las muestras purificadas con actividad antimicrobiana observada en las pruebas de difusión en agar. El medio MRS es un medio muy rico en proteína, esta gran cantidad influye al encontrarse como proteína contaminante en los procesos de purificación (Pat *et al.*, 2009). El uso de medios de cultivo con una menor cantidad de proteína o inclusive medios químicos definidos ayudan en la optimización en los pasos de purificación al no aportar proteína contaminante. Se ha reportado que las BAL son capaces de crecer y producir bacteriocinas (De Vuyst, 1995; Khan *et al.*, 2012) en dichos medios y que en algunos casos, se da un aumento en la producción de bacteriocinas por parte de la BAL (Liu *et al.*, 2017).

Para mejorar el proceso de purificación de la posible bacteriocina producida por la cepa 115 se optó por el uso del medio líquido definido (HSH), el cual contiene los nutrimentos necesarios para el crecimiento de BAL, la preparación del medio HSH se realizó como se describió previamente.

VERIFICACIÓN DEL CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO HSH y PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La evaluación de la capacidad de crecer en medio HSH de *Lactococcus lactis* cepa 115 se realizó de manera cualitativa observando la turbidez en un matraz con 25 mL de medio HSH inoculados al 1% variando la fuente de carbono, fructosa, sacarosa, glucosa, maltosa y lactosa, tras 24 horas de fermentación incubadas a 30 °C; se observó turbidez en las 5 muestras lo que indicó que la cepa 115 fue capaz de crecer empleando los 5 diferentes carbohidratos como fuente de carbono. *Lactococcus lactis* tiene la capacidad de metabolizar una gran cantidad de carbohidratos para la obtención de energía dentro de los cuales se encuentran los 5 carbohidratos empleados, así como rafinosa y arabinosa (Terence, 1980).

La cepa 115 fue capaz de crecer en el medio HSH empleando 5 carbohidratos para la obtención de energía, la capacidad para producir la sustancia con actividad antimicrobiana en medio HSH con los 5 diferentes carbohidratos como fuente de carbono por parte de la cepa 115 se verificó probando muestras de sobrenadantes liofilizados de 24 horas de fermentación.

Tabla 26. Halos de inhibición (DE) frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes* obtenidos en la prueba de difusión en agar empleando sobrenadantes liofilizadas tras 24h de fermentación con diferentes carbohidratos en medio HSH.

Fuente de Carbono	Halo de inhibición (mm)	
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Fructosa	11 (0.00)	11 (0.00)
Sacarosa	11.5 (0.70)	11 (1.41)
Glucosa	12 (0.00)	12 (0.00)
Maltosa	13(0.00)	13.5 (0.70)
Lactosa	14 (0.00)	14 (0.00)

En la tabla 26 se pueden observar los diámetros de los halos de inhibición producidos, para las 5 muestras se obtuvo actividad inhibitoria, siendo la muestra con fructosa como fuente de carbono la que obtuvo los halos más pequeños, mientras las muestras con lactosa como fuente de carbono presentaron los halos de inhibición de mayor tamaño frente a *Listeria innocua* y *Listeria monocytogenes*.

Las muestras con lactosa y maltosa como fuente de carbono presentaron los mayores halos de inhibición frente a las cepas de *Listeria*, siendo mayores inclusive que los observados en el medio MRS en las óptimas condiciones de producción. El posible aumento en la producción de bacteriocinas (observado como un aumento en el halo de inhibición) puede atribuirse a que en el medio HSH no hay proteína, la fuente de nitrógeno son aminoácidos siendo estos más fácilmente dirigibles debido a que no se requiere de la síntesis de enzimas proteolíticas para la digestión de proteínas en péptidos y oligopéptidos, así como proteínas de membrana para el transporte hacia el interior de la célula. La síntesis de bacteriocinas por BAL se ve favorecido por la presencia de péptidos pequeños, alrededor de 3000 a 6000 Da, lo que facilita su digestión y asimilación (Tavera, 2010).

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE CRECIMIENTO DE *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO HSH.

Se decidió realizar cinéticas de crecimiento con maltosa y lactosa como carbohidratos fermentables para determinar las mejores condiciones de crecimiento y de producción de la sustancia con actividad antimicrobiana.

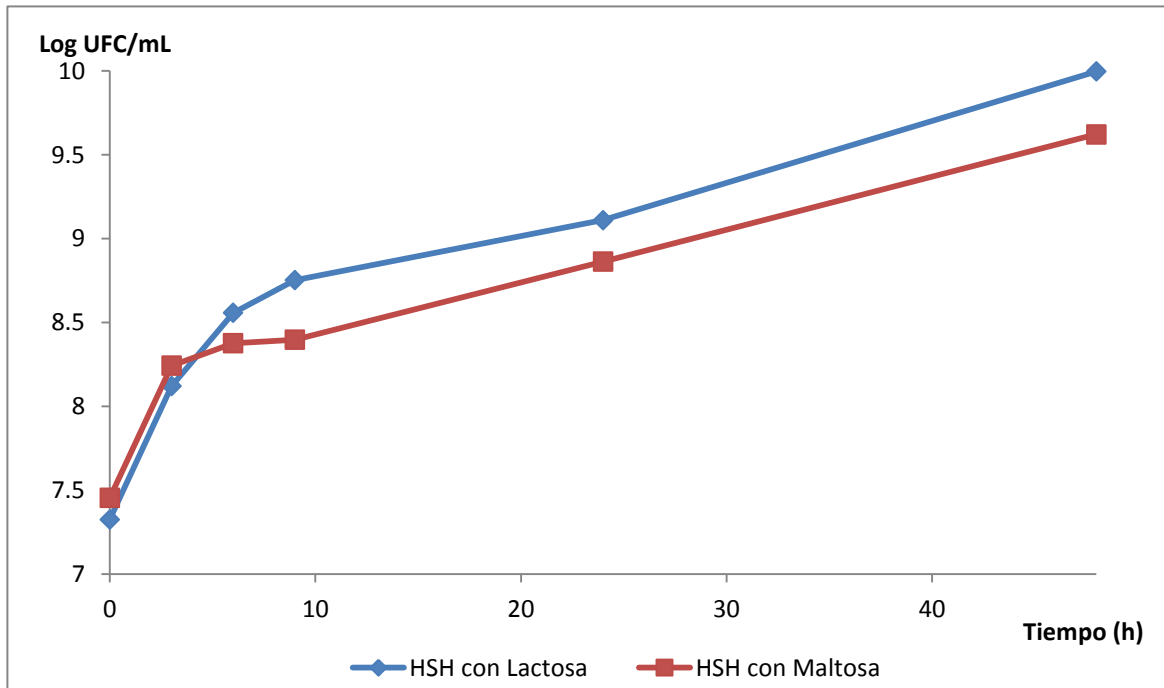


Figura 13. Valores de Log UFC/mL obtenidos por el método de cuenta en placa durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH comparando 2 fuentes de carbono, incubados a 30 °C durante 48 horas y pH de 6.5.

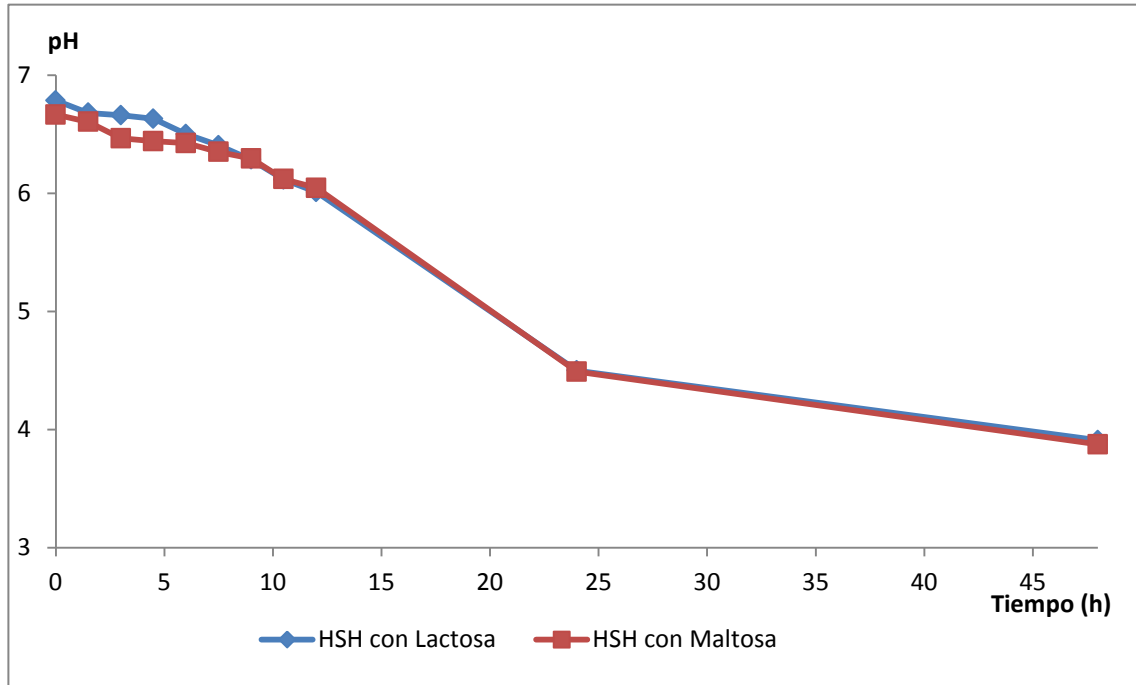


Figura 14. Curva de descenso del pH durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH comparando 2 fuentes de carbono, incubadas a 30 °C durante 48 horas, pH inicial de 6.5.

En la figura 13 se observan los resultados de cuenta en placa obtenidos durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH con lactosa y maltosa como fuentes de carbono. Para ambas fermentaciones el comportamiento es similar, no se observa una fase de latencia y la fase de crecimiento exponencial inicia rápidamente y se extiende hasta aproximadamente las 24 horas cuando comienza la etapa estacionaria misma que se prolonga hasta las 48 horas. Hay un crecimiento importante de la cepa 115 al aumentar un ciclo logarítmico en las cuentas obtenidas (figura 16) durante el tiempo comprendido entre las 24 y 48 horas (fase estacionaria). El crecimiento de la cepa 115 en medio HSH fue menor en comparación con el observado en el medio MRS, sin embargo, el cultivo se mantiene viable por un mayor tiempo alcanzando a crecer después de las 24 de fermentación.

El pH del medio al comienzo de la fermentación se encuentra entre un valor de 6.5-6.7 y comienza a descender conforme aumenta el tiempo de la fermentación, alcanzando valores de aproximadamente 4 a las 48h para ambas fermentaciones, como se observa en la figura 14.

El descenso del pH en el medio HSH no es tan marcado como en el medio MRS, ya que en las primeras 12 horas tan solo ha disminuido aproximadamente 0.5 unidades mientras que en el medio MRS en esa etapa de la fermentación el pH disminuyó 2 unidades en promedio, la disminución más lenta es un reflejo de una actividad metabólica más lenta produciendo un crecimiento más lento.

El medio con lactosa presentó un mejor crecimiento con respecto al medio con maltosa. En estudios sobre el metabolismo de *Lactococcus lactis* se observó un mejor crecimiento en medios con lactosa al poseer la maquinaria enzimática para su transporte y metabolismo (Garigues *et al.*, 1997), así como la capacidad de emplear a la galactosa proveniente de la lactosa para la síntesis de glucosamina compuesto del cual se genera N-acetil glucosamina, que forma parte de las paredes celulares lo que le da una mayor resistencia a la lisis en comparación con los medios con glucosa que terminan en lisis debido a daños inespecíficos en la célula producidos por el descenso del pH dada la rápida fermentación de la glucosa (Terence, 1968).

La capacidad de utilizar a la lactosa como fuente de carbono por parte de *Lactococcus lactis* aislados de leche o alimentos fermentados lácteos se atribuye a la presencia de un plásmido que presenta los genes necesarios para su transporte y catabolismo (sistema fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato PTS, 6-fosfo- β -galactosidasa y enzimas participantes en la vía tagatosa-6-fosfato). Si bien la cepa 115 fue aislada de atole agrio (fermentación no láctea), se ha reportado que cepas aisladas de fuentes vegetales (hierbas, frutas y vegetales) pueden emplear la lactosa como fuente de carbono sin necesidad de presentar dicho plásmido, para su metabolismo emplean vías alternas ya que presentan maquinaria similar como el caso del sistema específico para celobiosa PTS y una fosfo- β –glucosidasa que presenta actividad de fosfo- β -galactosidasa (Ho. V.T.T. *et al.*, 2017).

Para observar la capacidad de metabolizar una gran variedad de carbohidratos por parte de la cepa 115 se podría emplear un API50CH.

EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS DE PRODUCCIÓN DE LA SUSTANCIA ANTIMICROBIANA POR *Lactococcus lactis* CEPA 115 EN MEDIO HSH

Tabla 27. Halos de inhibición (DE) frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* y concentración de proteína (DE) de las muestras liofilizadas obtenidas durante diferentes etapas de la fermentación en medio HSH con lactosa de la cepa 115.

Tiempo de fermentación	Halo de inhibición (mm)		Concentración de proteína (μ g/mL)
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
6 horas	15 (0.00)	14.75 (0.35)	22.15 (3.32)
9 horas	16 (0.00)	16 (0.00)	23.55 (1.69)
24 horas	13.75 (0.35)	14 (0.00)	27.25 (0.01)
48 horas	-	-	24.55 (0.07)

Tabla 28. Halos de inhibición (DE) frente a *L. innocua* y *L. monocytogenes* y concentración de proteína (DE) de las muestras liofilizadas obtenidas durante diferentes etapas de la fermentación en medio HSH con maltosa de la cepa 115.

Tiempo de fermentación	Halo de inhibición (mm)		Concentración de proteína (µg/mL)
	<i>Listeria innocua</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
6 horas	15 (0.00)	15 (0.00)	12.80 (0.56)
9 horas	15.25 (0.34)	15.5 (0.35)	16.05 (0.07)
24 horas	13.75 (0.35)	13.75 (0.35)	33.40 (1.43)
48 horas	-	-	20.25 (0.35)

En las tablas 27 y 28 se muestran los valores de halos de inhibición producidos por las muestras del crecimiento en medio HSH de la cepa 115 con lactosa y maltosa respectivamente, así como la concentración de proteína de dichas muestras. Para ambos casos, las muestra de 9 horas presentan los mayores halos de inhibición frente a las muestras obtenidas a las 6 horas de fermentación, sin embargo el diámetro de los halos observados no aumenta al avanzar la fermentación, en contraste se observa una disminución e incluso para ambos casos en las muestras de 48 horas los halos obtenidos son tan pequeños que no se lograron medir con exactitud.

Los halos producidos por las muestras de lactosa con 9 horas de fermentación fueron los más grandes lo que indica que en esa etapa de la fermentación ocurre una mayor producción de la sustancia antimicrobiana, la concentración de proteína para las muestras de lactosa frente a las de maltosa es generalmente mayor lo que indicaría una mayor producción de sustancias proteicas, que coincide con el mejor crecimiento observado para el medio con lactosa como fuente de carbono.

El mayor crecimiento de *L. lactis* cepa 115 así como una mayor producción de la sustancia con actividad antimicrobiana en el medio HSH se presentó con lactosa como carbohidrato fermentable, pH inicial de 6.5, 30 °C como temperatura de incubación y 9 horas de fermentación.

PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

ADSORCIÓN/DESORCIÓN

Para llevar a cabo dicha metodología la fermentación se llevó a cabo en las óptimas condiciones de producción del compuesto antimicrobiano en el medio HSH (lactosa como fuente de carbono, pH inicial de 6.5, temperatura de incubación de 30 °C y 9 horas de fermentación).

Se realizó la prueba de difusión en agar (Tabla 29) para verificar la actividad antimicrobiana de la muestra obtenida por la metodología de adsorción/desorción, la presencia de halo de inhibición frente a las cepas de *Listeria* indicaron que la muestra purificada aún mantiene a la sustancia con actividad antimicrobiana producida por la cepa 115.

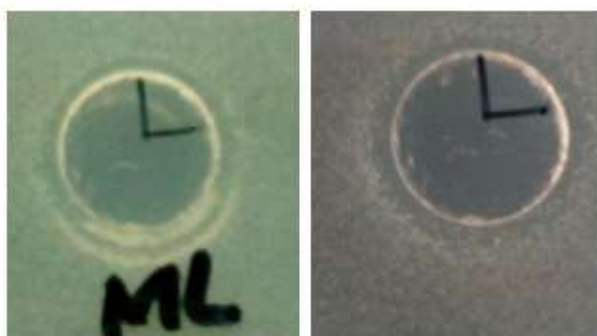


Figura 15. Halos de inhibición producidos por la muestra purificada por el método de adsorción/desorción en medio HSH-lactosa frente a *Listeria innocua* (izquierda) y *Listeria monocytogenes* (derecha).

Tabla 29. Halos de inhibición promedio (DE) frente a *L. monocytogenes* y *L. innocua* y concentración de proteína (DE) obtenido de la muestra purificada por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH-lactosa.

Halo de inhibición (mm)		Concentración de proteína (µg/mL)
<i>L. monocytogenes</i>	<i>L. innocua</i>	146.01 (1.83)
12(0.0)	12 (0.0)	

La concentración de proteína de la muestra obtenida fue menor en comparación con la muestra obtenida por la misma metodología pero en el medio MRS, sin embargo, el halo de inhibición obtenido fue aproximadamente igual. El exceso de proteína en la muestra con medio MRS es aportada por el mismo medio MRS, mientras que el medio HSH no aporta proteína a la muestra purificada.

PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO

Se realizó una fermentación bajo las condiciones óptimas de producción del compuesto antimicrobiano en el medio HSH (lactosa como fuente de carbono, pH inicial de 6.5, temperatura de incubación de 30 °C y 9 horas de fermentación). Se probó el mismo rango de concentración de 45 a 65 % de saturación con sulfato de amonio ensayado previamente para las muestras obtenidas con el medio MRS.

Se obtuvieron 10 muestras (sobrenadantes y precipitados correspondientes a las 5 concentraciones de saturación empleadas), pero solo se obtuvo precipitado visible en las fracciones con 45 y 50% de saturación. Todas las muestras se dializaron durante 24 horas para la eliminación del sulfato de amonio presente. Se determinó la concentración de proteína de todas las fracciones obtenidas y los resultados se muestran en la tabla 30. En casi todas las muestras la cantidad de proteína era tan baja que si bien daba positivo para la reacción con el reactivo de Bradford indicando que si había proteína en la muestra, la cantidad era tan baja que no se pudo calcular debido a que se sale de la curva de calibración, la única muestra a la cual se pudo realizar el ensayo fue el precipitado con 45 % de saturación, la concentración de dicha muestra fue menor comparándola con la misma fracción obtenida pero en medio MRS (tabla 23) debido probablemente a que no hay aporte de proteína contaminante por parte del medio HSH.

Tabla 30. Concentración promedio de proteína (DE) presente en las diferentes fracciones dializadas obtenidas durante la precipitación con sulfato de amonio. Medio HSH-lactosa.

Concentración de proteína (µg/mL)									
S45	P45	S50	P50	S55	P55	S60	P60	S65	P65
<125 (0.0)	214.305 (1.06)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)	<125 (0.0)

En la tabla 31, se muestran los halos obtenidos de las diferentes fracciones de la precipitación con sulfato de amonio en el medio HSH-lactosa. Al igual que en las muestras obtenidas en medio MRS (tabla 24) solo se presentó actividad inhibitoria en las muestras con los precipitados de 45 y 50% de saturación. La

muestra con el precipitado al 45% saturación presento el halo de inhibición más grande, indicando que en dicho porcentaje es el óptimo para la concentración y precipitación de la sustancia con actividad antimicrobiana producida por la cepa 115.

Tabla 31. Halos de inhibición promedio (DE) frente a *Listeria monocytogenes* y *Listeria innocua* obtenidos de las diferentes fracciones de la precipitación con sulfato de amonio en el sobrenadante del cultivo en medio HSH-lactosa de la cepa *Lactococcus lactis* 115.

Fracción	Halo de inhibición (mm)	
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Listeria innocua</i>
Sobrenadante 45%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 45%	12.0 (0.0)	13.0 (0.0)
Sobrenadante 50%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 50%	10.0 (0.0)	10.0 (0.0)
Sobrenadante 55%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 55%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Sobrenadante 60%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 60%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Sobrenadante 65%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Precipitado 65%	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)

Tabla 32. Tabla de purificación de la sustancia de origen proteico producido por *L. lactis* cepa 115 con actividad inhibitoria frente a *L. monocytogenes* en medio HSH-lactosa, comparando las muestras obtenidas por el método adsorción/desorción (A/D) y el precipitado de 45 % saturación con sulfato de amonio (P45).

Fracción	Proteína total (µg)	Actividad antimicrobiana (mm de inhibición)	Actividad antimicrobiana específica (mm de inhibición / µg proteína)	Rendimiento	Grado de purificación
Sobrenadante	4710	16	0.003	100 %	1
Muestra A/D	146.01	12	0.082	75 %	27
Muestra P45	214.31	12	0.055	75 %	18

En la tabla 32 se muestra la tabla de purificación realizada para las muestras purificadas obtenidas por ambas metodologías.

El rendimiento del proceso disminuye debido a una disminución en la actividad inhibitoria de las muestras purificadas, esto ocurre debido a que la muestra al

someterse a los procesos de purificación va perdiendo actividad por la eliminación de la proteína de interés en algunos de los pasos, así como los ciclos de congelación y descongelación que sufren las muestras; aun así durante un proceso de purificación exitoso la actividad total siempre disminuye conforme transcurre las etapas de purificación (Berg, 2002), pero aumentando la actividad específica.

De igual manera que ocurre con las muestras obtenidas en medio MRS, la actividad específica y el grado de purificación de la muestra obtenida por el método de adsorción/desorción en medio HSH-lactosa es mayor en comparación con el precipitado de 45% saturación.

CARACTERIZACIÓN

PERFIL PROTÉICO

El gel de electroforesis SDS-PAGE se realizó a las muestras purificadas, en la figura 16 se muestra la imagen del gel después de su tinción con azul de Coomasie.

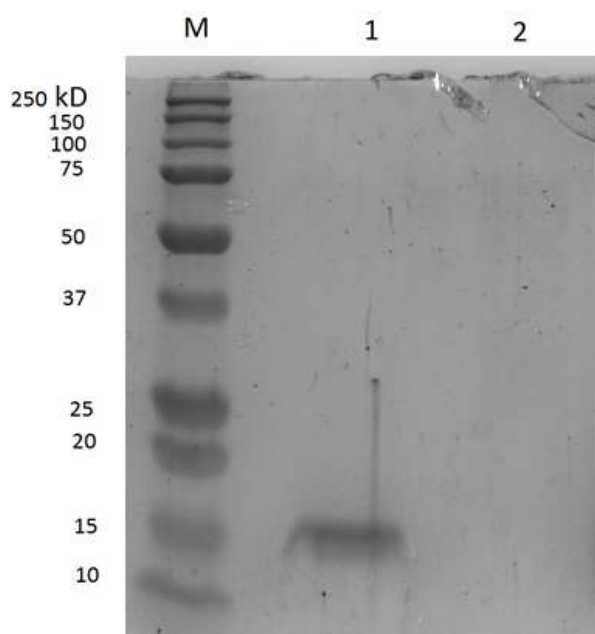


Figura 16. Gel SDS-PAGE (12.5% T) carril 1: marcador de peso molecular All Blue Precision plus protein standards BIORAD; carril 2: muestra obtenida por la técnica de adsorción/desorción; carril 3: muestra precipitada con sulfato de amonio (precipitado de 45% saturación).

En la figura 16 se observa el perfil electroforético obtenido, en él se cargaron las 2 muestras semipurificadas obtenidas en medio HSH-lactosa, el gel resultante muestra un gel más limpio al no observarse barridos ni bandas demasiado anchas e intensas.

En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular All Blue BIO-RAD, la muestra obtenida por la metodología de adsorción/desorción (carril 2) mostro una única banda bien definida entre los 10 y 15 KDa.

En la muestra con el precipitado del 45% de saturación (carril 3) se presentan unas bandas visibles a la vista aunque muy tenues, con pesos moleculares altos aproximadamente de 75 y 50 kDa, así como una banda de baja masa molecular muy tenue. Debido a su baja intensidad y tamaño al momento de tomar la imagen en el equipo no se logran apreciar las bandas en la figura 20, para una mejor visualización de las bandas se podría emplear una tinción con nitrato de plata ya que dicha metodología es más sensible en comparación con la tinción con azul de Coomasie y se logra una mejor visualización de las bandas tenues (baja concentración de proteína) al intensificar el color de la banda (Simpson, 2007).

ESTIMACIÓN DEL PESO MOLECULAR

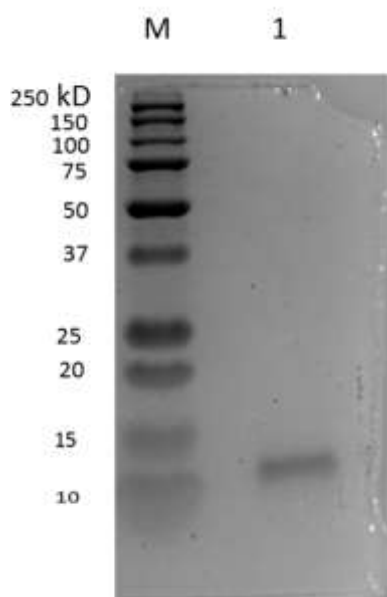


Figura 17. Gel SDS-PAGE (12.5 % T) M: marcador de peso molecular Carril 1: muestra obtenida por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH con tratamiento térmico y condiciones reductoras.

Mediante la curva de calibración realizada graficando el log del peso molecular de los estándares presente en el marcador de peso molecular All Blue Precision plus protein standards BIORAD contra el Rf (distancia recorrida por el estándar/ distancia recorrido por el frente) (Anexo 5) se pudo interpolar el Rf de la banda presente en el gel observada entre los 15 y 10 kDa producida por la muestra de adsorción/desorción en medio HSH, se estimó que la proteína asociada a la dicha banda presenta una masa molecular de 10.97 kDa.

DETECCIÓN DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA MEDIANTE ZIMOGRAMA

Para determinar si la banda observada en el gel SDS-PAGE con un peso molecular estimado de 10.97 kDa corresponde a la proteína con actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Listeria*, se realizó un zimograma empleando células de *Listeria innocua*, evitando utilizar a *Listeria monocytogenes* para no contaminar el equipo de electroforesis al ser un microorganismo patógeno y a *Micrococcus lysodeikticus* como control positivo al ser aceptado como microorganismo indicador por el Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) para pruebas de sensibilidad y actividad lítica, al ser este un microorganismo con una pared celular muy delgada y muy sensible a la acción de la lisozima (una peptidoglucanohidrolasa) y demás compuestos que afecten a su pared celular (Olvera-García *et al.*, 2015).

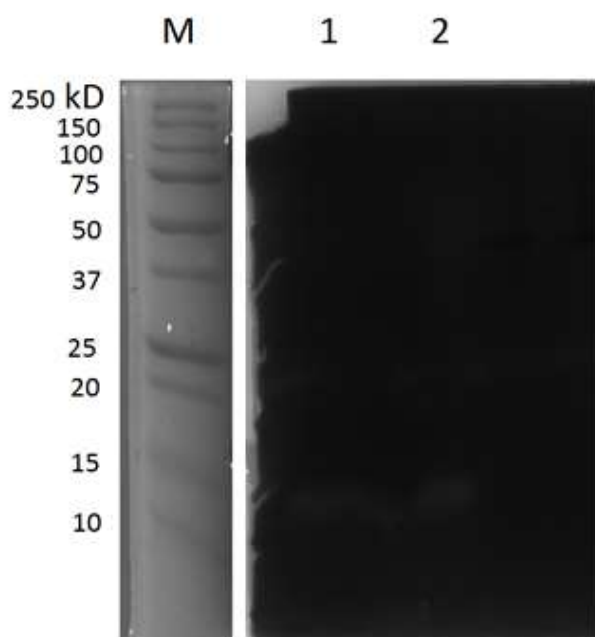


Figura 18. Zimograma (12.5 % T) con células de *Listeria innocua* M: marcador de peso molecular; carril 1: muestra obtenida por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH con tratamiento térmico y condiciones reductoras; carril 2: muestra obtenida por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH sin tratamiento térmico y condiciones no reductoras.

La figura 18 se muestra el gel obtenido después de la renaturalización y tinción con azul de metileno, para ambas muestras se observa una única banda de inhibición, ligeramente ancha y difusa, característica de las bacteriocinas (Segundo, 2017), la banda se localiza a una altura entre los 15 y 10 kDa.

La banda obtenida (banda clara sobre fondo oscuro) es el resultado de la acción sobre la integridad de la pared celular de las células presentes en el zimograma, daños sobre la pared celular generan bandas claras y traslúcidas, mientras que si ocurre la lisis de pared las bandas son de color blanco y estrechas típicas de PGHs y enzimas proteolíticas; las bacteriocinas generalmente dan como resultado bandas ligeramente anchas, claras y difusas (Pinto *et al*, 2009; Segundo, 2017).

Las bandas obtenidas no presentan diferencia entre si lo que indica que el tratamiento previo aplicado no tiene efecto alguno sobre la estructura y acción de la proteína presente en la muestra purificada contra las células de *Listeria innocua*, indicando que la posible bacteriocina presente en la muestra es termo resistente a diferencia de algunas bacteriocinas producidas por cepas de *Lactococcus lactis* las cuales son susceptibles a tratamientos térmicos intensos y pierden su actividad cuando se someten al tratamiento térmico previo antes de cargarse en los pozos del gel (Martínez, 1996). Las muestras tampoco perdieron su actividad al ser expuestas a un agente reductor como el β -mercaptoetanol.

Para la realización del zimograma se evitó la precipitación con TCA a la cual fueron sometidas las muestras purificadas antes de ser cargadas en los geles SDS-PAGE, debido a que si bien la precipitación con TCA si es capaz de precipitar a la proteína presente en la muestra (posible bacteriocina), el TCA desnaturaliza las proteínas perdiendo la actividad enzimática (Corona, 2018), pudiendo también interferir en la estructura y actividad de proteínas de menor tamaño como las bacteriocinas, debido a que la proteína presente en la muestra ya no presentaba acción inhibitoria frente a las células de *Listeria innocua*, ya que en geles donde se cargaron muestras precipitadas con TCA no se observaba ninguna banda de inhibición (imagen del zimograma no presentado).

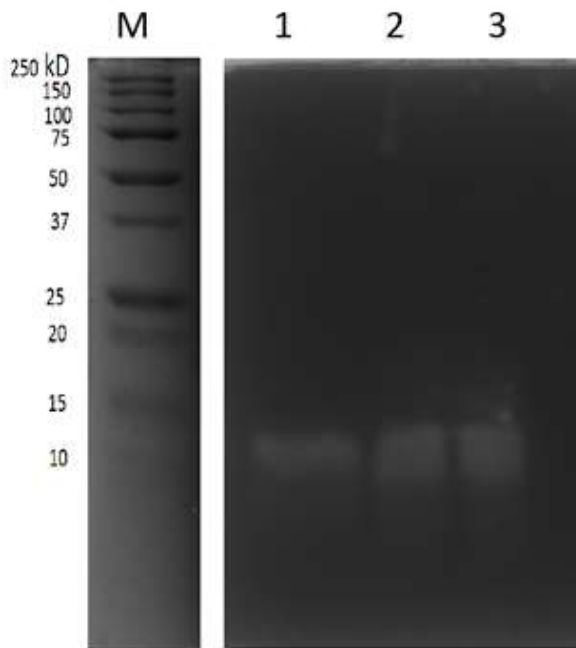


Figura 19. Zimograma (12.5 % T con células de *Micrococcus lysodeikticus*. M: marcador de peso molecular. Carril 1: muestra obtenida por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH con tratamiento térmico y condiciones reductoras, carriles 2 y 3: muestras obtenidas por la metodología de adsorción-desorción en medio HSH sin tratamiento térmico y condiciones no reductoras

La figura 19 muestra el zimograma con células de *Micrococcus lysodeikticus* obtenido, se observa la aparición de una única banda entre 10 y 15 kDa, al igual que en el caso del zimograma de *L. innocua*, el tratamiento previo de las muestras no afecta a la acción sobre la pared de las células presentes en el gel, las bandas observadas en el gel con células de *M. lysodeikticus* son más intensas y se observa un mejor contraste esto debido a la alta sensibilidad que presenta dicho microorganismo frente a la alteración de la estructura de su pared celular por acción de compuestos antimicrobiano (Nakimbugwe, 2006).

La proteína asociada a la banda observada en el gel SDS-PAGE presenta un peso molecular estimado de 10.97 kDa y es la responsable de la actividad inhibitoria frente a *Listeria innocua*; dicha proteína presenta un bajo peso molecular y termoestabilidad, características similares a las bacteriocinas pudiendo ser clasificada como una. Las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* presentan pesos moleculares entre 3-6 kDa (Zendo *et al.*, 2003). La nisina presenta un peso de 3.4 kDa, mientras que la lacticina LMG producida por *Lactococcus lactis* T196 presenta un tamaño de 3.5 kDa (Bello *et al.*, 2016). Otras bacteriocinas presentan tamaños similares como la bacteriocina KT2WL la cual es ligeramente superior a los 3.5 kDa (Hwanlemh *et al.*, 2013) y 3.4 kDa la bacteriocina KT2W2L (Aslam *et al.*, 2012).

La posible bacteriocina aislada producida por *Lactococcus lactis* cepa 115 presenta un peso molecular mayor a las reportadas en la literatura, sin embargo, algunos autores reportan un rango más amplio para el tamaño de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* de entre 3-10 kDa (Aslam *et al.*, 2012). Algunas bacteriocinas aisladas de alimentos fermentados tradicionales presentan tamaños mayores como el caso de la bacteriocina ST712B2 con 14.3 kDa producida por *Lactobacillus pentosus* aislado de Boza (Todorov & Dicks, 2007) y la bacteriocina NKSM1 con 12.3 kDa producida por *Pediococcus pentosaceus* aislada de Appam fermentado (Kumar *et al.*, 2018).

SECUENCIACIÓN

Se realizó la secuenciación de la proteína, posible bacteriocina producida por la cepa 115, asociada a la banda observada en el gel SDS-PAGE (Figura 21).

Durante la comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de proteínas bacterianas del NCBI (Centro Nacional para la Información Bioinformática) se encontró que la secuencia obtenida podría asociarse a más de una proteína, en la tabla (Anexo 4.) se muestra una tabla con una lista de proteínas registradas la base de datos del NCBI que se pueden asociar a proteínas presentes en la banda que se mandó a secuenciar.

Durante la liofilización se pueden presentar agregados de proteínas (Roy *et al.*, 2004; de Vries *et al.*, 2017) y las bacteriocinas pueden asociarse con otros péptidos de similar tamaño (Carolissen-Mackay *et al.* 1997), por lo que se pudo haber dado el caso de que durante la purificación del compuesto antimicrobiano se formaran estos agregados proteicos y que durante la electroforesis SDS-PAGE los agregados de proteínas no pudieron separarse correctamente generando que las otras proteínas migraron junto a la posible bacteriocina producida por la cepa 115 visualizándose como una única banda.

La posible presencia de proteínas ribosomales (proteínas mayormente asociadas a secuencias encontradas en la banda mandada a secuenciar L115)

puede deberse a que durante alguna etapa del proceso de purificación ocurriera la lisis celular y que las proteínas ribosomales salieran al sobrenadante y al presentar pesos moleculares similares a la sustancia antimicrobiana (posible bacteriocina) se asociaran formando agregados proteicos, sin embargo no hay reporte en la literatura que alguna de las etapas de la metodología de adsorción/desorción empleada tenga como consecuencia la lisis celular.

Si bien no se pudo lograr una purificación completa y secuenciación de la sustancia con actividad antimicrobiana producida por la cepa 115, dicha sustancia si se encuentra en la muestra purificada al presentar actividad inhibitoria en la prueba de difusión en agar y observarse una banda de actividad inhibitoria en el zimograma.

CONCLUSIONES

Las condiciones óptimas para la producción de la sustancia con actividad antimicrobiana producida por *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS fueron: glucosa como fuente de carbono, pH inicial del medio= 7.5, temperatura de incubación= 30 °C y tiempo de incubación: 9 horas, coincidiendo con las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa 115.

Las condiciones óptimas para la producción de la sustancia con actividad antimicrobiana producida por *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH fueron: lactosa como fuente de carbono, pH inicial del medio= 6.5, temperatura de incubación= 30 °C y tiempo de incubación: 9 horas, coincidiendo con las condiciones óptimas de crecimiento de la cepa 115.

Mediante la precipitación con sulfato de amonio y el método de adsorción/desorción se concentró y purificó parcialmente la sustancia con actividad antimicrobiana manteniendo su actividad inhibitoria. El rango de concentración donde se precipitó la sustancia producida por la cepa 115 es de 45-50% de saturación, siendo el precipitado de 45% de saturación donde se presentó la mayor cantidad y actividad inhibitoria.

Con el método de adsorción/desorción se eliminó la mayor cantidad de proteína contaminante, siendo la mejor metodología al lograr un mayor grado de purificación.

La proteína con actividad antimicrobiana frente a *Listeria innocua* presentó una masa molecular estimada de 10.9 kDa.

No se logró secuenciar la proteína con actividad antimicrobiana.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo más etapas de purificación para lograr la eliminación de las proteínas contaminantes y tener lo más pura posible a la proteína con actividad antimicrobiana y llevar a cabo la secuenciación de la cadena de aminoácidos de la proteína e identificar si es una bacteriocina ya reportada o una que aún no se conoce.

Optimizar el método de precipitación con sulfato de amonio; probando diferentes concentraciones de saturación entre el rango de 45-50% así como optimizar la diálisis al aumentar el tiempo de diálisis o emplear una cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel).

Determinar la concentración mínima inhibitoria de la proteína ya purificada (Díaz *et al*, 2016).

BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, M., 2008, Identificación de bacteriocinas producidas por *Enterococcus* sp. Aisladas de productos cárnicos, tesis de maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, México DF.

Aslam, M., Shahid, M., Reham, F. & Murtaza, M., 2012, Production optimization and characterization of a low molecular weight bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, African journal of microbiology research, volume 30, pp: 5924-5933.

Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. & Lefebvre, G., 2001, Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19, International Journal of Food Microbiology, Volume 68, pp:93-104

Axelsson, L., 1993, Clasificación de bacterias ácido lácticas y fisiología In: Salminen, S. and von Wright, A. (Eds.), Lactic acid bacteria. Marcel Dekkers Inc., New York.

Baker, R., Winkowski, K., & Montville, T., 1996. pH-controlled fermentors to increase production of leuconocin S by *Leuconostoc paramesenteroides*. Process Biochemistry, pp. 225–227

Barker, H.A., 1961, In the Bacteria, New York: Academic press, volumen 2, pp: 151.

Batt, C.A., 1999, *Lactococcus*. Department of food science, Cornell University, USA.

Bello, O., Bankolea, A. & Babalolab, O., 2016, Molecular screening of bacteriocin produced by lactic acid bacteria from *Irvingia gabonensis* seeds, Nature and Science, volumen 14(8), pp:67-78.

Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, E., Lacroix, D. & Fliss, I., 2012, Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture, Applied and environmental microbiology, volume 68, pp: 3683-3690.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002, Bioquímica, quinta edición, WH Freeman, New, York.

Beristain-Bazua, S.C., Palou, E., Lopez-Malo, A., 2012, Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos, Temas selectos de ingeniería en alimentos, volumen 6-2, pp: 64-78.

Bintsis, T., 2018, Lactic acid bacteria: their applications in foods, Journal of Bacteriology & Mycology, volume 6, pp: 89-94.

Bolaños-Acuña, H., Acuña-Calvo, M., Duarte-Martínez, F., Salazar-Castro, W., Oropeza-Barrios, G., Sánchez-Salazar, L. & Campos-Chacón, E., 2005,

Brotos de diarrea e intoxicaciones transmitidas por alimentos en Costa Rica, Acta médica Costarricense, volumen 49, pp: 205-209.

Bolotin, A., Wincker, P., Mauger, S., Jaillon, O., Malarme, K., Weissenbach, J., Dusko Ehrlich S. & Sorokin A., 2001, The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403, Genome research, pp 731-752.

Borresen, EC., Henderson, A.J., Kmar, A., Weir, TL., Ryan, EP., 2012, Fermented foods: patented approaches and formulations for nutritional supplementation and health promotion, Recent patents on Food, Nutrition & Agriculture, volumen 4, pp: 134-140.

Camacho. A, M. Giles, A. Ortega, 2009, Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos, segunda edición, facultad de Química, UNAM, cuenta en placa de bacterias disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/TecnicBasicas-Cuenta-en-placa_6527.pdf fecha de acceso: [19-Marzo-2018]

Carolissen-Mackay, V., Arendse, G. & Hastings, J.W., 1997, Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers, Int J Food Microbiology, volume 34(1), pp: 1-16.

Carr, I., Chill, D. & Maida, N. 2002, The lactic Acid Bacteria: a literature Survey. Critical Reviews in Microbiology.

Carrillo, G., Redondo, M. & Arias, M.L., 2010, Capacidad de formación de biopelículas de cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas a partir de queso tierno de origen costarricense. Archivo Latinoamericano de Nutricion, volume 60(2), pp: 175-8.

Chopin, M-C., Chopin, a., Rouuault, A. & Galleron, N., 1889, Insertion and Amplification of foreign genes in the *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chromosome, Applied and Environmental Microbiology, pp: 1769-1774.

Chung, H.J. & Yousef, A.E., 2005, *Lactobacillus curvatus* produces a bacteriocin-like agent active against Gram-negative pathogenic bacteria, Journal of food safety, volumen 25, pp: 59-79

Corona, A., 2018, Estudio de la actividad peptidoglicano hidrolasa extracelular nativa de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Dahl, T.A., Midden W.R. & Hartman P.E., 1989, Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen, Journal bacterial, volume 171, pp: 2188-2194.

De Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G. and Penna, T.C.V., 2009, Nisin biotechnological production and application: a review. Trends Food Sci. Technology, volume 20, pp: 146-154.

De Vries, A., Gomez, Y., Jansen, Bas, van der IJnden, E. & Scholten, E., 2017, Controlling Agglomeration of Protein Aggregates for Structure Formation in Liquid Oil: A Sticky Business, ACS Appl Mater Interfaces, volume 9(11), pp: 10136–10147.

De Vuyst L., 1995, Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis subsp. lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. J Appl Bacteriol, volume 78, pp: 28–33.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., 1994, Antimicrobial potencial of lactic acid bacteria, In Bacteriocins of lactic acid bacteria, Springer US, pp: 91-142.

De Vuyst, L., Callewaert., Crabbe, K., 1996, Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin under unfavourable growth conditions. Microbiology, pp: 817-827.

Delgado, A., Dulce, B., Cidalia, P. & Arroyo-Lopez, F., 2005, Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration, Food Microbiology pp: 521-528.

Delves-Broughton, J., 1998, Use of nisin in processed and natural cheese, Bull int, Dairy fed, volume 329, pp: 13-17.

Delves-Broughton, J., 2005, Nisin as a food preservative. Food Australia, volume 57(12), pp: 525-527.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, J. & Hugenholtz, J, 1996, Applications of the bacteriocina, nisin, Antonie van Leeuwenhoek, volume 69, pp: 193-202.

Demarigny, Y., Soldat, V. & Gemelas, L., 2015, From *Streptococcus lactis* to *Lactococcus lactis*: A qualitative and quantitative analysis of the scope of research undertaken around a microbial concept, Journal Scientometric, Volumen 2.

Diaz, G. & Wachter C., 2003, Métodos para el estudio de comunidades microbiana en alimentos fermentados, Revista latinoamericana de microbiología, Volumen 45, pp: 30-40.

Díaz M.A, De la Fuente N.M., 2016, Análisis preliminar de las concentraciones mínimas inhibitorias de bacteriocinas de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis*, Investigcion y desarrollo en ciencias y tecnologías de alimentos, Vol. 1 No. 1, pp: 322-327.

Dimitrieva-Moats, G.Y. & Unlu, G., Development of Freeze-Dried Bacteriocin-Containing Preparations from Lactic Acid Bacteria to Inhibit *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, Probiotics Antimicrob Proteins, volume 4(1), pp: 27-38.

Eifert, J.D., Gennins, C., Duncan S.E. & Hackney S.R., 1996, Predictive model with improved statistical analysis of interactive factors affecting growth of *Staphylococcus aureus*, E.J. Food, volume 59, pp: 608-614.

Esquivel, A., 2012, Estudio de las enterobacterias presentes en el atole agrio de Villahermosa, Tabasco, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Farber, J.M. & Peterkin, P.I., 1991, *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen, Microbiology review, volume 55(3), pp: 476-511.

Fen Goh, H. & Koshy, P., 2015, Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Weissella confusa* A3 of Dairy Origin, PLOS one Journal, volume 10, pp: 1-17.

Fennema, O., Srinivasan, D. & Kirk, P., 2010, Química delos alimentos, 3 Ed. Acribia.

Franchi, M., Tribst, A. & Cristianini, M., 2012, The effect of antimicrobials and bacteriocins on beer spoilage microorganism, International food research journal, volume 19, pp: 783-786.

Garrigues, C., P. Loubiere, N. D. Lindley, & M. Cocaign-Bousquet., 1997, Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio, J. Bacteriology, volume 179, pp: 5282-5287.

Golomb, B. & Marco, M., 2014, *Lactococcus lactis* Metabolism and Gene Expression during Growth on Plant Tissues, Journal of bacteriology, volume 197(2), pp: 371-381.

Guadarrama, D., 2006, Tipificación de bacterias lácticas aisladas del axocotl, atole agrio de la sierra norte de Puebla, por medio de ARDRA (tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Guerra, N.P. & Pastrana, L. 2003. Influence of pH drop on both nisin and pediocin production by *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici*. Letters in Applied Microbiology, volumen 37, pp: 51-55.

Guerrero, G., 2017, Cuantificación de bacterias lácticas amilolíticas y determinación de los cambios químicos durante la fermentación del atole agrio, elaborado con maíz morado del estado de Tlaxcala (tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Harris, L., Daeschel, M., Stiles, M., & Klaenhammer, T. 1989, Antimicrobial activity of acid bacteria against *Listeria monocytogenes*, Journal of food protection, volume 2, pp. 385-386

Hartayanie, L., Lindayani, L. & Santoso L., 2018, The Effect of Carbon and Nitrogen Supplementation on Bacteriocin Production of Lactic Acid Bacteria from Pickled Yellow Bamboo Shoots (*Dendrocalamus asper*), Microbiology Indonesia, pp:7-14.

Heredia-Castro, P., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A., & Vallejo-Cordoba, B., 2017, Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos, *Interciencia*, volumen 42.

Herrera, T., 1993 “Semblanza del estudio de las bebidas y los fermentados mexicanos. Alimentos fermentados indígenas de México”. *Alimentos fermentados indígenas de México*, Universidad Nacional Autónoma de México, 21-27.

Ho, V.T.T., Lo, R., Bansal, N. & Turner, M., 2017, Characterization of *Lactococcus lactis* isolates from herbs, fruits and vegetables for use as biopreservatives against *Listeria monocytogenes* in cheese, *Food control*, volume 85, pp:472-483.

Hwanlemh, N., Biscola, V., El-Ghaish, S. & Jafres, E., 2013, Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria Isolated from Mangrove Forests in Southern Thailand as Potential Bio-Control Agents: Purification and Characterization of Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L, *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, volumen 5(4), pp:264-278.

Jack. R.W., Tagg, R.J. & Ray, B. 1995, Bacteriocin of Gram positive bacteria, *Microbiology reviews*, volume 2, pp: 171-200.

Jay, J.M., 2000, Fermentation and fermented dairy products in modern food microbiology, 6th edition, Aspen publishers, USA, pp: 113-130.

Jeevaratnam K, Jamuna M, Bawa AS., 2005, Biological preservation of foods - bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian J Biotechnol*, pp: 446–454.

Jin, T., 2010, Inactivation of *Listeria monocytogenes* in skim milk and eggs white by antimicrobial botte coating with polylactic acid and nisin, *Journal of food science*, volumen 75, pp: 83-88.

Khalil, R., Elbahloul, Y., Djadouni, F., Omar, S., 2009, Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by a newly isolated *Bacillus megaterium* 19 strain. pp 101–102.

Khan, H., Flint, S.H. & Yu, P., 2012, Development of a chemically defined medium for the production of enterolysin A from *Enterococcus faecalis* B9510, *Journal of Applied microbiology*, volume 4, pp: 102-109.

Kumar, K., Devadas, S., Murugan, S. & Krishnan, S., 2018, Production and characterization of bacteriocin by lactic acid bacterium- *Pediococcus pentosaceus* NKSM1 isolated from fermented ‘appam’ batter, *Journal of Pure and Applied Microbiology* volume 12(3), pp: 1315-1330.

Kummar, A. & Kummar, D., 2014, Isolation and characterization of bacteria from dairy samples of Solan in Himachal Pradesh for identification of *Lactobacillus* spp, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, volume 25(2), pp: 110-114.

Lara, E., 2018, Producción y caracterización de compuestos similares a bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus* sp. aislada de alimentos fermentados tradicionales, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

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

Leveau, J. & Bouix, M., 2000, Microbiología industrial. Los microorganismos de interés industrial. Zaragoza, España: Ed Acribia. 595 p.

Liu, W., Zhang, L. & Yi H., 2017, Development of a chemically defined medium for better yield and purification of enterocin Y31 from *Enterococcus faecium* Y31, *Journal of food quality*, 2017, pp: 1-8.

Llorente, B.A., 1998, Evaluación de la producción de bacteriocinas de *Pediococcus acidilactici* bajo diferentes condiciones de cultivo, tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Lopez, C., 2005, Efecto del pH y de la temperatura en el crecimiento de bacterias del genero *Streptococcus* aisladas del pozol, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

López-Malo, A., Palou, E., Parish, M.E., Davidson, P.M. 2005. Methods for activity assay and evaluation of results. En: Davidson, P.M., Sofos, J.N., Branen, A.L. (Eds.). *Antimicrobials in Foods*. 3a, Ed. Taylor and Francis, Boca Ratón. pp. 654-680.

Madigan, M. T., Maetinko, J. M., & Parker, J. 2009, *Biology of microorganisms* (12th edition), New York, Prentice Hall.

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, México.

Martinez, B., 1996, Bacteriocinas de *Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: nisina z y lactococina 972, Tesis de Doctorado, Universidad de Oviedo.

Martínez, F., Yulan, C., Villafañe, R., Cardozo, M., Vasek, O., 2009. Efecto de la temperatura en el crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis*, *Comunicación científica y tecnológica*.

Matamoros, M. F., Pilet, F. Gigout, H. Prévost, F. Leroi, 2009, Selection and evaluation of seafood-borne psychotropic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. *Food Microbiology*. pp. 638,640-643.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. & Drosinos, EH., 2002. Influence of pH and temperature by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. *Meat Science*, pp. 265-271.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H., 2003, Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science, volumen 64, pp: 265-271.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M., Drosinos, E.H., 2002. Influence of pH and temperature by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Science, pp. 265-271

Meira M, LaPointe G, Lacroix C, Lavoie MC., 2000, MICs of mutacin B-Ny266, nisin A, vancomycin, and oxacillin against bacterial pathogens. Antimicrob Agents Chemother., 44:24–29

Mellado, G., 2019, Caracterización y purificación de sustancias antimicrobianas producidas por una cepa de *Streptococcus* spp. aislada del pozol, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Mondragón, G., Escalante, P., Osuna, J. A., Ibarra, V. I., Morlett, J. A., Aguilar, C. N. & Rodríguez, R., 2013, Bacteriocinas: características y aplicación en alimentos, Investigación y Ciencia de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, volumen 59, pp: 63-69.

Montville, T., 2000, Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos, Microbiología de alimentos fundamentos y fronteras, Acibia, S. A. Zaragoza pp. 13-28, 30

Mora, N. & García A., Susceptibilidad de bacterias ácido lácticas (BAL) frente a varios antibióticos, (tesis de licenciatura), Universidad Nacional del Estado de Hidalgo, México.

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 Microbiology Letters.

Nout, R., Sarkar, K. & Beuchat R., 2007, Indigenous fermented food, Food microbiology, fundamentals and frontiers, 3rd Ed., Washington D.C.

Olvera-García, M., Serrano-Maldonado, C. & Quirasco, M., 2015, Detección de Proteínas con Actividad Antibacteriana Producidas por Bacterias Ácido Lácticas, Biotecnología Vol. 19, No. 1.

Owens J.D., Keddie R. M., 1969, The nitrogen nutrition of soil and herbage coryneform bacteria. Journal Applied Bacteriology, volumen 32, pp: 338–347.

Pal, A., Ramana, K.V. & Bawa, A.S., 2010, Simplification and optimization of de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium for enhanced production of bacteriocin by *Weissella paramesenteroides* DFR-8, J Food Science Technology, volumen 47(3), pp: 258–265

Parra, R., 2010, Bacterias Ácido Lácticas: Papel funcional en los alimentos, Facultad de Ciencias Agropecuarias, volumen 8(1), pp: 93-105.

Phathanibul, P., Taylor, T., Davidson, P, & Harte, F., 2009, Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin, Journal of food microbiology, volume 129, pp: 316-320.

Pingitore, E., Salvucci, E., Sesma, F.& Nader-Macias M.E., 2007, Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB), Centro de Referencia para Lactobacilos San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.

Pingitore, V., Bru, E. & Nader-Macías, E., 2012, Effect of lyophilization and storage temperature on the activity of salivaricin CRL 1328, a potential bioactive ingredient of a urogenital probiotic product, J Gen Appl Microbiol., volume 58(2), pp: 71-81.

Pinto, A.L., Fernandez, M., Pinto, C., Albano H., Castilho, F., Teixeira, P. & Gibbs, P., 2009, Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolate from shellfish: potential antimicrobials to control non-fermented seafood, Aquaculture research, volume 129, pp: 8-50.

Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, P.A., 1999. Microbiology 4th Ed., McGraw Hill Sciences. USA.

Rapa, M., Stoica, P., Tanase, E. & Grosu, E., 2013, Preparation of medical devices with antimicrobial properties, optoelectronics and advanced materials-rapid communications volume 15(78) pp: 807-816.

Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., Ball A., 1982, Relationship between 803 temperature and growth rate of bacterial cultures, Journal of Bacteriology volume 149, pp: 804 1–5.

Roy, I. & Gupta M.N., 2004, Freeze-drying of proteins: some emerging concerns, Biotechnol Appl Biochem, volume 39(2), pp: 165-77.

Sadiq, S., Imran, M., Hassan, M.N., Iqbal, M., Zafar, Y., & Hafeez, F.Y., 2014, Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. LWT- FoodSciences Technological, volume 59, pp: 204–210.

Salmieri, S., Islam, F., Khan, R. & Hossain, F., 2014, Antimicrobial nanocomposite films made of poly(lactic acid)-cellulose nanocrystals (PLA-CNC) in food applications: Part A-effect of nisin release on the inactivation of *Listeria monocytogenes* in ham, Cellulose, volume 21(3) pp: 1837-1850.

Sandine, W.E., Elliker, P.R. & Hays, H., 1962, Cultural studies on *Streptococcus diacetilactis* and other members of the lactic *Streptococcus* group, Canadian Journal of Microbiology, volume 8(2), pp: 161-174.

Scheleifer, K., Kraus, J., Dvorak, C., & Klipper-Balz, R., 1985, Transfer of *Streptococcus lactis* and Related Streptococci to the Genus *Lactococcus* gen. nov., Systematic and Applied Microbiology, volumen 6(2), pp: 183–195.

Segundo, J.A., 2017, Estudio de compuestos antimicrobianos de origen proteico por *Enterococcus faecium* MXVK76, tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Sihma, V., Sood, S., Kumariya, R. & Kumari, A., 2012, Simple and rapid purification of pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* NCDC 273 suitable for industrial application, Microbiological Research, volume 167(9), pp: 544-9.

Simpson, R.J., 2007, Staining proteins in gels with silver nitrate, CSH Protocol.

Sivaramasy, E., Neelamegam, N., Mayavu, P. & Thangavel, P., 2014, Production Purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum, Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, volume 4, pp: 305-315.

Souza, E., Souza, P., Dominguez, J., Converti, A. & Souza R., 2016, Influencia de la temperatura y pH en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por *Lactococcus lactis* CECT-4434, CyTA journal of food, volumen 15, pp: 525-530.

Stark, P. & Sherman, J.M., 1935, Concerning the Habitat of *Streptococcus lactis*, Journal of Bacteriology, 639-646.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. & Wannamaker, L.W., 1976, Bacteriocins of Gram-positive bacteria. Bacteriological Reviews, volumen 40, pp: 722-756.

Tavera, F., 2010, Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas de pozol para la inhibición de bacterias patógenas, Tesis de licenciatura, facultad de Química UNAM.

Terence, D.T., 1968. Metabolism of acid lactic bacteria (tesis de doctorado), Massey University, New Zealand.

Terence, D.T., Keith, W., Turner & Vaughhan, L., 1980, Galactose Fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*: Pathways, Products, and Regulation, Zealand Dairy Research Institute, Palmerston North, New Zealand. pp:672-682.

The Complete Genome Sequence of the Lactic Acid Bacterium *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* IL1403, Genome research, volume 11(5), pp: 53-71.

Todorov, S. & Dicks L., 2007, Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from Boza, Brazilian Journal of Microbiology volume 38(1), pp: 166-172.

Trinetta, V., Rollini, M. & Manzoni, M., 2008, Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochem*, volumen 43, pp: 1275–1280.

Valderrama, A., 2012, Diversidad de bacterias lácticas del atole agrio de Villahermosa Tabasco, tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Vallejo, M., Ledesma, P., Anselmino, L. & Marguet, E., 2014, Efecto de las condiciones de crecimiento y composición del medio de cultivo sobre la producción de bacteriocina de *Enterococcus mundtii* Tw56, *Revista Colombiana de biotecnología*, pp.174-179.

Van Hijum, S.A., Vaughan E.E., & Vogel R.E., 2013, Application of state-of-art sequencing technologies to indigenous food fermentations. *Current opinion in biotechnology*, volume 24, pp:178-186.

Wacher, C., 2014 la biotecnología alimentaria antigua: los alimentos fermentados, *revista digital universitaria*, volumen 15 numero 8, pp. 12-13

Wacher, C., Cañas, A., Cook, PE., Barzana, E., and Owens, JD., 1993, Sources of microorganism in pozol, a traditional Mexican fermented maize dough. *World J. Microbiology and Biotechnology*, volumen 9, pp: 269-274.

Walker, S.T., 2000, *Microbiología*, 1 ed. McGraw-Hill interamericana, México DF. pp 301-302.

Wilkins, P., Bourgeois, R., Murray, R., 1972, Psychotropic properties of *Listeria monocytogenes*, *Canadian Journal of Microbiology*, volume 18(5), pp: 543-551.

Yang R, Ray B., 1994, Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, volume 11, pp: 281–291.

Yang, E., Fan, L., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., 2018 Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheese and yogurts. *AMB Express*, 10(2):48.

Yang, R., Johnson, M.C. & Ray B., 1992, Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied Environ Microbiology*, volumen 58, pp: 3355–3359.

Zendo T., Fukao, M., Ueda, T., Higuchi, T., Nakayama, J. & Sonomoto, K., 2003, Identification of the lantibiotic nisinQ, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, volume 67, pp: 1616-1619.

Zottola, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B. & Roberts R.F., 1994, Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in others foods, *International journal of food microbiology*, volumen 1(2), pp: 227-238.

ANEXOS

ANEXO 1. Composición del caldo MRS, Difco TM Lactobacilli.

Ingrediente	g/L
Proteosa peptona No. 3	10
Extracto de carne	10
Extracto de levadura	5
Dextrosa	20
Polisorbato 80	1
Citrato de amonio	2
Acetato de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.1
Sulfato de manganeso	0.05
Fosfato dipotásico	2

ANEXO 2. Composición del caldo MRS BHI Oxoid

Ingrediente	g/L
Solidos de infusión de corazón	5
Solidos de infusión de cerebro	12.5
Proteosa peptona	10
Glucosa	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato disódico	2.5

ANEXO 3. Curvas de crecimiento de la cepa 115 en caldo MRS (densidad óptica)

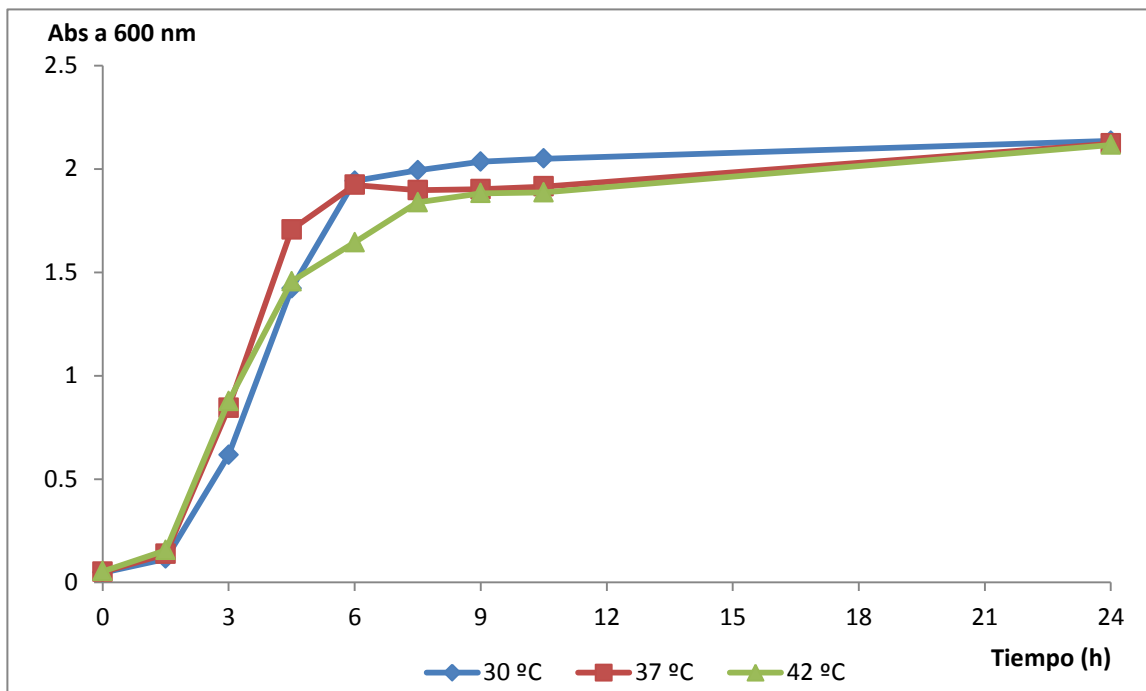


Figura 20. Evaluación del efecto de la temperatura sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS manteniendo el pH inicial constante (6.5) (Densidad óptica, 600nm).

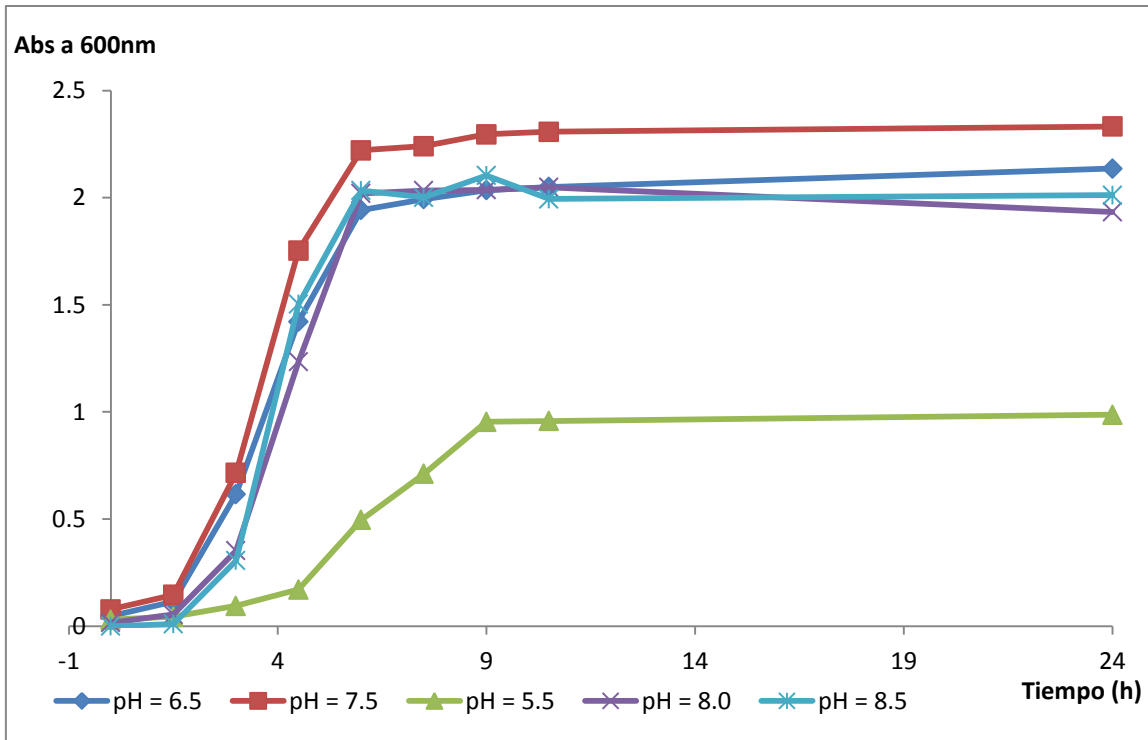


Figura 21. Evaluación del efecto del pH inicial de medio sobre el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio MRS manteniendo la temperatura constante (30 °C) (Densidad óptica a 600nm).

Anexo 4. Curva de crecimiento de la cepa 115 en caldo HSH (densidad óptica)

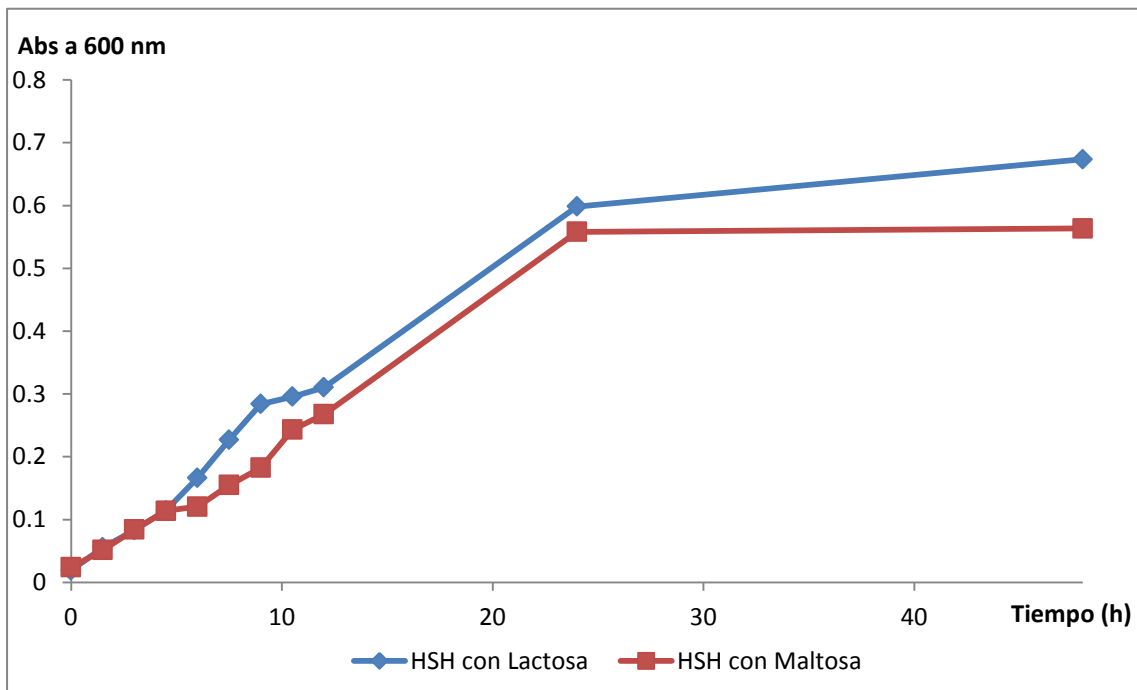


Figura 22. Valores densidad óptica medios a 600nm obtenidos durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* cepa 115 en medio HSH comparando 2 fuentes de carbono, incubados a 30 °C, durante 48 horas, pH 6.5.

ANEXO 5. Estimación del peso molecular de la proteína asociada a la banda L115.

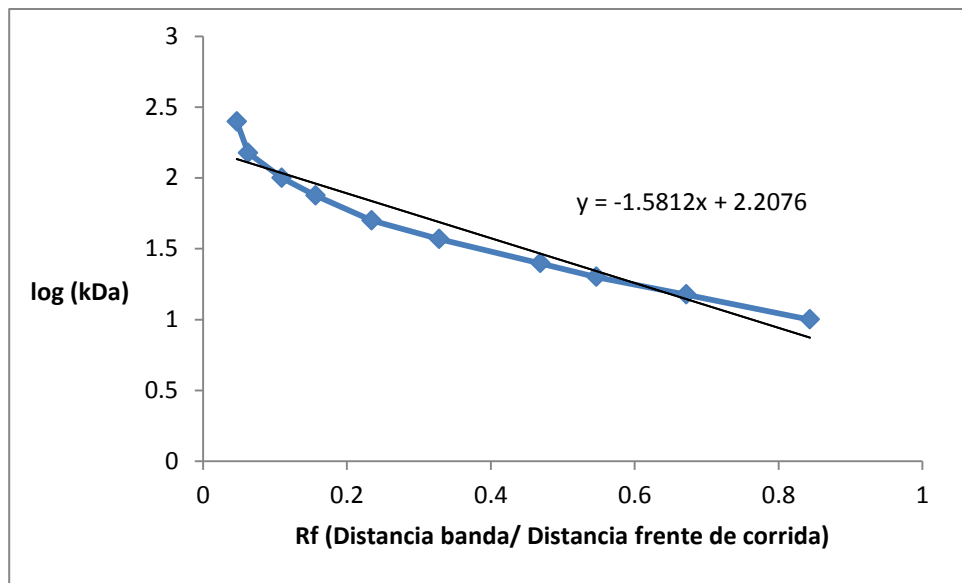


Figura 25. Curva de calibración para estimar el peso molecular de la banda observada en el gel SDS-PAGE presente en la muestra semipurificada por la metodología de adsorción/desorción en medio HSH-lactosa.

Ejemplo de los cálculos realizados para la estimación del peso molecular:

$$Rf \text{ banda} = \frac{\text{Distancia banda}}{\text{Distancia frente de corrida}}$$

$$Rf \text{ banda} = \frac{4.7 \text{ cm}}{6.4 \text{ cm}} = 0.73$$

$$\log(\text{kDa}) = -1.5812(Rf) + 2.2076$$

$$\log(\text{kDa}) = -1.5812(0.73) + 2.2076 = 1.0404$$

$$\log(\text{kDa}) = 1.0404$$

$$\text{Peso molecular de la banda en kDa} = 10^{1.0404} = \underline{\underline{10.97 \text{ kDa banda}}}$$

ANEXO. 6 Comparación de la secuencia obtenida con la base de datos de proteínas bacterianas del NCBI (Centro Nacional para la Información Bioinformática).

Romina_20190225_Refseq_Lactococcus_20190308_Lactococcus_Bacterion_SCAFF4 (1), Protein report created on 03/11/2019	
Experiment: Romina_20190225_Refseq_Lactococcus_20190308_Lactococcus_Bacterion_SCAFF4 (1)	
Peak List Generator:	unknown
Version:	unknown
Charge States Calculated:	unknown
Deisotoped:	unknown
Textual Annotation:	unknown
Database Set:	1 Database
Database Name:	Refseq_Lactococcus
Version:	unknown
Taxonomy:	All Entries
Number of Proteins:	0
Explain Database w/ < 1000 entries:	
Does database contain common contaminants?:	unknown
Search Engine Set:	1 Search Engine
Search Engine:	Mascot
Version:	Mascot in Proteome Discoverer 2.3.0.523
Samples:	All Samples
Fragment Tolerance:	0.020 Da (Monoisotopic)
Parent Tolerance:	10.0 PPM (Monoisotopic)
Fixed Modifications:	+57 on C (Carbamidomethyl)
Variable Modifications:	+16 on M (Oxidation)
Database:	Refseq_Lactococcus (unknown version, 0 entries)
Digestion Enzyme:	Trypsin
Max Missed Cleavages:	2
Probability Model:	
	QE_20190309_ADH_01: Peptide Prophet with Delta Mass Correction [+2 and below,+3,+4 and above]
	QE_20190308_ROD_01 Band L115: Peptide Prophet with Delta Mass Correction [+2 and below,+3,+4 and above]
Scaffold:	Version: Scaffold_4.8.6
Modification Metadata Set:	2334 modifications
Source:	D:\Program Files\Scaffold 4\parameters\unimod.xml
Comment:	
Protein Grouping Strategy:	Experiment-wide grouping with protein cluster analysis
Peptide Thresholds:	90.0% minimum
Protein Thresholds:	95.0% minimum and 1 peptide minimum
Peptide FDR:	0.4% (Decoy)
Protein FDR:	2.3% (Decoy)
GO Annotation Source(s):	
Alternate ID Source(s):	

Experiment	Biological sa	Biological sa	MS/MS sam	Cluster	Protein nam	Protein acce	Database soi	Protein mol	Protein iden	Exclusive un	Exclusive un	Total spectr	Percentage	Percentage sequence cov
Romina_201	00-BLK befor	00-BLK befor	QE_2019030	Cluster of M	MULTISPECIE WP_0031298	Refseq_Lacti		7,018.60	65.30%	0	0	0	0.00%	0.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of hy	hypothetical ARE26761.1,	Refseq_Lacti		8,641.30	100.00%	2	2	6	0.04%	28.70%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:PCS14037.1,	Refseq_Lacti		11,742.40	100.00%	2	2	3	0.02%	21.60%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of ty	type Z 30S ril TBH80329.1	Refseq_Lacti		7,134.60	100.00%	8	10	27	0.20%	70.50%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of hy	hypothetical GAX48449.1,	Refseq_Lacti		36,017.30	99.30%	1	1	1	0.01%	5.34%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of M	MULTISPECIE WP_0109054	Refseq_Lacti		9,676.30	100.00%	6	6	10	0.07%	71.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:EQC55419.1,	Refseq_Lacti		10,033.60	100.00%	5	8	41	0.30%	67.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37503.1,	Refseq_Lacti		6,676.60	100.00%	6	10	65	0.48%	80.70%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of XF	XRE family tr WP_096814437.1-DECOY			0	96.20%	1	1	3	0.02%	0.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:TBH80433.1	Refseq_Lacti		6,651.60	97.00%	1	1	8	0.06%	45.60%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of hy	hypothetical AXN64535.1,	Refseq_Lacti		3,998.70	100.00%	3	3	12	0.09%	57.10%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37502.1	Refseq_Lacti		5,997.50	100.00%	6	8	15	0.11%	69.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QJH46371.1	Refseq_Lacti		5,553.60	100.00%	4	5	10	0.07%	51.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:PCS12467.1,	Refseq_Lacti		5,182.30	100.00%	3	3	34	0.25%	36.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37291.1	Refseq_Lacti		10,876.50	100.00%	14	26	54	0.40%	85.10%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:ARE06951.1,	Refseq_Lacti		15,376.70	100.00%	2	2	3	0.02%	18.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37600.1,	Refseq_Lacti		7,173.30	100.00%	13	14	29	0.22%	75.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:QBC36936.1,	Refseq_Lacti		8,353.30	100.00%	7	11	48	0.36%	59.70%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:PCS00631.1,	Refseq_Lacti		6,308.60	99.90%	1	1	2	0.01%	16.90%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:QBC37436.1,	Refseq_Lacti		14,042.20	100.00%	3	3	3	0.02%	24.60%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of co	cold-shock p QBC37577.1	Refseq_Lacti		7,123.80	100.00%	2	2	2	0.01%	40.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37278.1	Refseq_Lacti		4,421.20	100.00%	4	7	18	0.13%	73.70%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:PCS10346.1,	Refseq_Lacti		15,097.80	100.00%	4	5	12	0.09%	21.20%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:WP_1019616	Refseq_Lacti		12,928.30	100.00%	6	6	9	0.07%	37.70%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of el	elongation f PCS12686.1,	Refseq_Lacti		43,212.00	100.00%	2	2	3	0.02%	10.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37041.1	Refseq_Lacti		7,876.60	100.00%	8	9	26	0.19%	59.10%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:ATZ01015.1	Refseq_Lacti		13,145.40	100.00%	7	8	9	0.07%	64.90%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	SSU ribosom:GAX48120.1	Refseq_Lacti		10,098.70	99.90%	0	0	7	0.05%	30.20%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:PCS14042.1,	Refseq_Lacti		10,570.10	100.00%	12	16	30	0.22%	62.10%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:PCS14055.1,	Refseq_Lacti		12,346.30	100.00%	1	1	15	0.11%	50.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of rp	rpsO protein KRO23034.1,	Refseq_Lacti		10,378.60	100.00%	6	6	10	0.07%	22.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:GBG96394.1	Refseq_Lacti		9,981.50	99.90%	1	1	20	0.15%	46.80%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:CDG05437.1,	Refseq_Lacti		13,489.20	99.50%	1	1	2	0.01%	10.80%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 50	50S ribosom:QBC37300.1,	Refseq_Lacti		10,727.90	100.00%	1	1	1	0.01%	12.40%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of rik	ribosomal pr KLK97013.1,	Refseq_Lacti		10,281.30	100.00%	6	6	40	0.30%	56.50%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of hy	hypothetical EHE93790.1,	Refseq_Lacti		13,303.50	99.80%	1	1	2	0.01%	10.20%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of tr	translation ii RZ149236.1	Refseq_Lacti		8,195.70	100.00%	1	1	1	0.01%	25.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of 30	30S ribosom:TBH80333.1	Refseq_Lacti		10,176.90	100.00%	0	0	9	0.07%	27.90%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of ty	type B 50S ril QBC36731.1	Refseq_Lacti		9,336.70	100.00%	5	6	27	0.20%	84.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of hy	hypothetical AXN64970.1,	Refseq_Lacti		8,549.90	100.00%	7	7	9	0.07%	67.10%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of M	MULTISPECIE WP_0031319	Refseq_Lacti		9,371.30	100.00%	2	5	45	0.33%	58.00%
Romina_201	01-Band L11	01-Band L11	QE_2019030	Cluster of M	MULTISPECIE WP_0031298	Refseq_Lacti		7,018.60	100.00%	16	23	157	1.16%	70.70%
END OF FILE														