



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

PURIFICACIÓN DE UNA BACTERIOCINA MEDIANTE EL MÉTODO DE ADSORCIÓN Y LIBERACIÓN ESPECÍFICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA:

VERÓNICA SANTIAGO CRUZ

2786/05





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: Profesor Eduardo Barzana García

Vocal: Profesor Raúl Aguilar Caballero

Secretario: Profesora Ana Olivia Cañas Urbina

Primer suplente: Profesora María de los Angeles Valdivia López

Segundo suplente: Profesora Aurora Irma Ortegón Avila

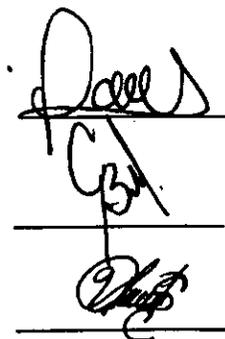
Sitios en donde se desarrollo el tema:

- Laboratorio 321 del Edificio E del Depto. de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM.
- Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado de Alimentos, Facultad de Química, UAQ.
- Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Asesor del tema: Dra. Ana Olivia Cañas Urbina

Supervisor técnico: M. C. Blanca E. García Almendárez

Sustentante: Verónica Santiago Cruz



The image shows three handwritten signatures, each written on a horizontal line. The top signature is the most legible, appearing to be 'Ana Olivia Cañas Urbina'. The middle signature is less legible but appears to be 'Blanca E. García Almendárez'. The bottom signature is also less legible but appears to be 'Verónica Santiago Cruz'.

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del CONACYT, a través del proyecto J28010-B.

AGRADEZCO

- A la Dra. Ana Cañas su apoyo, confianza y cariño dejándome participar en este trabajo.
- A la M en C. Blanca García y al Dr. Carlos Regalado la hospitalidad que me dieron en Querétaro, brindándome el apoyo técnico necesario, en el laboratorio a su cargo.
- Al Dr. Edgardo Escamilla sus comentarios y las valiosas aportaciones realizadas al presente trabajo.
- Al Dr. Antonio Pérez Alonso su apoyo y las facilidades brindadas para la realización de este trabajo.
- A la Dra. Sandra Naranjo su ayuda y consejos.
- A Erika, Rosa María, Lidia, Irma, Sandra, Lucha, Miguel y Rubén, la ayuda que indirectamente me brindaron en determinadas ocasiones.

GRACIAS

A Dios por todo lo que me ha dado y por permitirme terminar mis estudios.

A mis padres por su amor, apoyo, confianza, sus valiosos consejos y sacrificios realizados en mi beneficio, impulsándome a la superación personal y profesional.

A mis hermanos Alejandra, Erika y Edgar(†) por su cariño, apoyo, amistad y compañía. Misión cumplida.

A todos mis amigos por su amistad y cariño, espero contar con ustedes siempre.

CONTENIDO

	1
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	2
II. GENERALIDADES	4
2.1 Bacteriocinas	4
2.1.1 Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas	4
2.1.1.1 Estructura	11
2.1.1.2 Espectro de inhibición	11
2.1.1.3 Clasificación de bacteriocinas	12
2.1.1.4 Unidades de actividad	12
<u>2.1.1.4.1 Unidades internacionales</u>	14
<u>2.1.1.4.2 Unidades arbitrarias</u>	14
2.2 Bacteriocina WB1	14
2.3 Purificación de una bacteriocina	15
2.3.1 Etapa inicial: precipitación	16
2.3.2 Etapa de separación o purificación	19
2.3.2.1 Adsorción liberación específica	19
2.3.3 Etapa final: diálisis y liofilización	19
2.4 Determinación del peso molecular	20
2.4.1 Identificación de las bandas con actividad	21
III. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo general	22
3.2 Objetivos específicos	22
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Medios de cultivo y soluciones	23
4.1.1 Medios de cultivo	23
4.1.2 Soluciones	23
4.2 Microorganismos	24
4.2.1 Conservación de cepas	24
4.2.2 Cultivos de trabajo	24
4.2.3 Preparación de inóculo	25
4.3 Producción de la bacteriocina WB1	27
4.3.1 Cinética de crecimiento	27
4.3.2 Determinación de biomasa	27
4.4 Determinación de actividad	27

4.4.1 Preparación del extracto libre de células (ELC)	28
4.4.2 Preparación de cajas con <i>M. luteus</i>	28
4.4.3 Cuantificación de actividad	30
4.5 Determinación de proteínas	30
4.5.1 Preparación de muestras para la determinación de proteínas	31
4.5.2 Cuantificación de proteínas	31
4.6 Purificación por el método de adsorción-liberación	32
4.6.1 Adsorción	32
4.6.2 Liberación	32
4.7 Concentración de la bacteriocina	34
4.7.1 Diálisis	34
4.7.2 Liofilización	34
4.8 Efecto del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1	34
4.9 Determinación del peso molecular de la bacteriocina WB1	35
4.10 Identificación de bandas con actividad	35
V. RESULTADOS	37
5.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento de <i>L. lactis</i>	37
5.2 Influencia del pH y temperatura en el crecimiento de <i>M. luteus</i> ATCC10420	37
5.3 Crecimiento y producción de bacteriocina por <i>L. lactis</i> en medio CST-C	37
5.4 Purificación por el método adsorción liberación	40
5.5 Cambios de actividad durante el proceso de diálisis	40
5.6 Efecto del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1	40
5.7 Determinación del peso molecular de la bacteriocina WB1	44
5.8 Identificación de bandas con actividad	44
VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	46
6.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento de <i>L. lactis</i>	46
6.2 Influencia de la temperatura y del pH en el crecimiento de <i>M. Luteus</i> ATCC10420	46
6.3 Crecimiento y producción de la bacteriocina WB1 por <i>L. lactis</i> en medio CST-C	47
6.4 Adsorción a pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y liberación a pH 2	48
6.5 Adsorción a pH 5.5 y liberación a pH 2	49

6.6 Liberación a pH 2 sin previa adsorción	49
6.7 Cambios de actividad de la bacteriocina WB1 durante el proceso de diálisis	50
6.8 Efecto del tween 80 en el proceso de purificación	52
6.9 Determinación del peso molecular	53
VII. CONCLUSIONES	56
VIII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS POSTERIORES	58
APENDICE 1	59
APENDICE 2	61
IX. BIBLIOGRAFIA	62

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas	6
Tabla 2. Espectro de inhibición de algunas bacteriocinas	10
Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas	13
Tabla 4. Métodos empleados en la secuencia de purificación de las bacteriocinas	17
Tabla 5. Crecimiento de <i>L. Lactis</i> y producción de bacteriocina WB1 en diferentes medios de cultivo	38
Tabla 6. Adsorción de la bacteriocina WB1	42
Tabla 7. Curso temporal de la liberación de la bacteriocina WB1 a pH 2 sin previa adsorción	42
Tabla 8. Cambios en la actividad de la bacteriocina WB1 durante el proceso de diálisis	43
Tabla 9. Efecto del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1	43
Tabla 10. Comparación de pesos moleculares de bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	55

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Diagrama del método de adsorción-liberación	20
Figura 2.	Identificación de bandas correspondientes a una bacteriocina en SDS-PAGE sin teñir (zimogramas)	21
Figura 3.	Diagrama de flujo para la selección del medio de cultivo para la preparación del inóculo de <i>L. lactis</i>	25
Figura 4.	Preparación del inóculo para la producción de bacteriocina WB1	26
Figura 5.	Preparación del inóculo de <i>M. luteus</i>	26
Figura 6.	Preparación de <i>M. luteus</i> para determinación de actividad	29
Figura 7.	Diagrama de adsorción-liberación para la bacteriocina WB1	33
Figura 8.	Efecto de la temperatura de inoculación en el crecimiento de <i>M. luteus</i> en agar assay 0.8%	38
Figura 9.	Efecto del pH en el crecimiento de <i>M. luteus</i> ATCC10420	39
Figura 10.	Curva de crecimiento de <i>L. lactis</i> en medio CST-C a 30°C	39
Figura 11.	Adsorción de la bacteriocina WB1 a las células de <i>L. lactis</i> en medio de cultivo CST-C a diferentes valores de pH	41
Figura 12.	Liberación de la bacteriocina WB1 en buffer de NaCl 100 mM pH 2	41
Figura 13.	Gel 12-19% SDS-PAGE Glicina teñido con azul de Coomassie	45
Figura 14.	Fracciones del gel SDS-PAGE sometidas a incubación con <i>M. luteus</i> como microorganismo indicador	45

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la utilidad del método de adsorción-liberación como método de purificación de la bacteriocina WB1 producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de pozol.

Se determinó la adsorción de la bacteriocina WB1 a valores de pH de 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5, relacionándolo con la subsecuente liberación a pH 2. Así mismo, se determinó el tiempo óptimo de adsorción a pH 8.5 y el tiempo óptimo de liberación a pH 2.

Se estudió también los efectos que tienen en la actividad de la bacteriocina WB1 el proceso de diálisis y el efecto del tween 80 en la purificación. Por otra lado, se estandarizaron los factores que pudiesen afectar el crecimiento del microorganismo indicador (*M. luteus* 10420). Además se determinó la relación que existe entre el crecimiento de *L. lactis*, el pH y la actividad de la bacteriocina WB1.

Se encontró que la bacteriocina WB1 se adsorbe mejor a pH 6.5-7.5 que a pH 8.5 y 5.5. Así mismo, se observó que la liberación fue mayor (200 UA/mL) sin previa adsorción que cuando se adsorbió (100, 50 UA/mL). De acuerdo a lo anterior se puede decir que, al finalizar la fermentación, un porcentaje (40%) de la bacteriocina WB1 se encuentra adherida a la célula y el resto se encuentra en el medio de cultivo. Por lo anterior, se decidió hacer la purificación sin previa adsorción. Por otro lado, se comprobó que el tween 80 no beneficia el proceso de purificación y que la diálisis provoca pérdida de actividad de hasta un 50%.

Se concluye que el método de adsorción-liberación es de utilidad como método de purificación de la bacteriocina WB1. Se encontró que la bacteriocina está formada por 6 péptidos con un rango de peso molecular de 4,001 a 11,776 Da. En la literatura sólo se han reportado sistemas de 2 o 3 péptidos. Por lo tanto, este trabajo sienta las bases para continuar con los estudios de la bacteriocina WB1 para poder determinar la estructura de cada uno de los péptidos y confirmar si se trata de un nuevo sistema de bacteriocinas.

I. INTRODUCCIÓN

Las bacteriocinas son péptidos producidos por los microorganismos como mecanismo de defensa. Las bacteriocinas producidas por Bacterias Acido Lácticas (BAL) son de especial interés en la industria alimentaria por su potencial como "bioconservadores" orientándose a sustituir o reducir el uso de los conservadores químicos (nitritos, sulfitos, benzoatos, sorbatos, etc.), los cuales pueden ser acumulables en el ser humano y por ende, dañinos.

Hasta el momento, sólo existen tres bacteriocinas patentadas: Nisina, Pediocina PA-I y Termofilina, de las cuales sólo las dos primeras son comercializadas para su uso en alimentos.

La escasa cantidad de bacteriocinas disponibles en el mercado tiene varias razones. Una de ellas es que investigaciones largas y complicadas pueden conducir a secuencias idénticas para bacteriocinas diferentes. También es común que se enfrente la pérdida de actividad durante los procesos de fermentación y/o purificación; o que la bacteriocina tenga un espectro de actividad similar al de otras ya existentes en el mercado.

La secuencia de investigación para la aprobación del uso de una bacteriocina en alimentos es la siguiente:

- Monitoreo de la actividad bacteriocínica en cepas de interés y determinación del espectro de actividad contra microorganismos indicadores.
- Purificación de la bacteriocina

- Determinación de la secuencia de aminoácidos
- Determinación del mecanismo de acción de la bacteriocina contra microorganismos patógenos de interés.

En investigaciones previas dentro de este grupo de trabajo, se monitoreó la actividad bacteriocínica de BAL aisladas de pozol. De las cepas productoras de bacteriocinas, se escogió la de *Lactococcus lactis* susp *lactis*, que produce la bacteriocina denominada WB1.

En el presente trabajo, se realizaron estudios de purificación de la bacteriocina WB1. La purificación de bacteriocinas es una tarea difícil, porque no existe un método establecido. Los métodos más comúnmente empleados son: precipitación con sulfato de amonio seguido de una combinación de cromatografías (filtración en gel, afinidad, intercambio iónico). Existen otros métodos alternativos, como el método de adsorción-liberación y la cromatografía de inmunoafinidad.

El objetivo de este trabajo fue determinar la utilidad del método de adsorción liberación como método de purificación de la bacteriocina WB1.

II. GENERALIDADES

2.1 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos producidos como mecanismo de defensa por algunos microorganismos (Klaenhammer, 1993; Dykes, 1995; Zheng y Slavik, 1998). El estudio de las bacteriocinas comenzó en 1925 cuando Gratia, en Bélgica, observó que una sustancia de naturaleza proteica liberada por una cepa de *E. coli* inhibía el crecimiento de otras cepas bacterianas (De Vuyst y Vandamme, 1994). Dichas sustancias fueron denominadas como colicinas. Más tarde, se encontraron sustancias similares producidas por *Pseudomonas pyocyaneus* (piocinas), *Bacillus megaterium* (megacinas) y un sin número de bacterias ácido lácticas (pediocinas, lactococinas, lantioninas, etc.). El grupo en conjunto recibe en la actualidad el nombre de bacteriocinas (Jiménez-Díaz y col., 1995; Axelsson y Holk, 1995; Kaiser y Montville, 1996; Aktypis y col., 1998).

2.1.1 Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son microorganismos Gram-positivos, anaerobios facultativos generalmente no esporulados. Debido su estatus GRAS (Generally Recognized as Safe) las BAL son ampliamente utilizadas en la industria alimentaria, sobre todo en alimentos fermentados (Stiles, 1996; Marrug, 1991). Los géneros de BAL más comúnmente utilizados en alimentos son: *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* y *Leuconostoc* (Yildirim y Johnson, 1998).

Las bacteriocinas producidas por BAL son de especial interés en la industria alimentaria por su potencial como "bioconservadores" orientándose a sustituir o

reducir el uso de los conservadores químicos (nitritos, sulfitos, benzoatos, sorbatos, etc.) los cuales pueden ser acumulables en el ser humano y por ende dañinos (Van Reenen y col., 1998; Luchasky, 1999).

Se estima que, tan sólo en Estados Unidos, se producen alrededor de 9,000 muertes cada año causadas por enfermedades transmitidas por alimentos y que la incidencia de estas enfermedades va de 24 a 81 millones de casos anuales. En Europa, las enfermedades transmitidas por alimentos son la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades respiratorias (Luchasky, 1999). Ante este panorama, las bacteriocinas producidas por BAL han sido objeto de un intenso escrutinio científico y tecnológico durante los últimos 20 años (Tabla 1). Sin embargo, sólo un pequeño número de ellas han tenido un potencial económico significativo (Ríos y col., 1999). La nisina es comercializada como Nisaplin por Applin & Barret (UK), como Ambicin por AMBI Inc. (USA) y como Chrisin por Chr. Hansen (DK). La Pediocina PA-1 es comercializada por QUEST International como ingrediente en una mezcla denominada ALTA 2341 y, finalmente, NESTLE patentó la Termofilina 1 y Termofilina 2 en 1997 (Germond y col., 1997).

La escasa cantidad de bacteriocinas disponibles en el mercado tiene varias razones. Una de ellas es que investigaciones largas y complicadas pueden conducir a secuencias idénticas para bacteriocinas diferentes. También es común que se enfrente la pérdida de actividad durante los procesos de fermentación y/o purificación o que la bacteriocina tenga un espectro de actividad similar al de otras

Tabla 1. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas.

GENERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	REPORTADA POR
Lactococcus	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454	Nisina A	Rogers(1928);Mattick& Hirsch(1944,1947)
	NIZO 22186 10 300 71 6F3 CNRZ 481 DRC1 ADRIA 85LO30	Nisina Z Lactostrepcina 1 Lactostrepcina 2 y 3 Lactostrepcina 4 Bac V, VI y VII Lacticina 481 Dricina Lactococina DR	Mulders y col. (1991) Kozak y col. (19779 Kozak y col. (1978) Kozak y col. (1978) Geis y col. (1983) Piard y col. (1990) Powell y col. (1990) Thualt y col (1991); Dufor y col. (1991)
	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var <i>diacetylactis</i> 6F7 WM4 S50 DPC938	Bac VIII Bac WM4 Bacteriocina S50 Lactocina D	Geis y col. (1983) Schervitz y col. (1983) Kojic y col. (1991) Morgan & Hill (1993)
Lactobacillus	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> 346 202 9B4, 4G6 LMG2081 9B4	Diplococina Lactostrepcina 5 Bac I, II, III y IV Lactococina A Lactococina A, B y M	Rogers (1928); Oxford (1944) Kozak y col (1978) Geis y col. (1983) Holo y col. (1991) Geis y col (1983); Van Belkum y col. (1989)
	LMG2081 R	Lactococina G Lactococina R	Nissen-Meyer y col. (1992) Yildirim & Johnson (1998)
	<i>Lb. acidophilus</i> (no especificado) DDS1 2181 N2 11088 M46 LAPT 1060 TK8912 TK9201	Lactocidina Acidofilina Acidolina Lactacina B Lactacina F Bacteriocina M46 Acidocina B Acidofilucina A Acidocina 8912 Acidocina A	Vicent y col. (1959) Vakil & Shahani (1965) Hamdan & MikolajciK (1973) Barefoot & Klaenhammer (1983) Muriana & Kaenhammer (1987) Ten Brink y col. (1990) Ten Brink y col. (1994) Toba y col. (1991c) Kanakani y col. (1992) Kanatani y col. (1995)
<i>Lb. amylovorus</i> LMG P-13139	Lactobina A	Contreras y col. (1997)	
<i>Lb. Bavarucus</i> MI401	Bavaricina A	Larsen y col. 1993)	
<i>Lb. brevis</i> (no especificado)	Lactobrevina	Kavasnikov & Sudenki (1967)	

GENERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	REPORTADA POR	
<i>Lactobacillus</i>	B37	Brevecina 37	Rammelsberg & Radler (1990)	
	<i>Lb. casei</i> B80 LHS	Caseicina 80 Caseicina LHS	Rammelsberg & Radler (1990) Dicks y col. (1992)	
	<i>Lb. curvatus</i> LTH 1174	Curvacina A	Tichaczek y col (1992)	
	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> DDS14	bulgaricana	Reddy & Shahani (1971)	
	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> No especificado JCM 1106, JCM 1107 JCM 1248	Lactobacillina Lacticina A Lacticina B	Wheater y col. (1951) Toba y col. (1991a) Toba y col. (1991b)	
	<i>Lb. fermentum</i> 466	Bacteriocina 466	De Klerk & Coetzee (1961)	
	<i>Lb. gasserii</i>	Gasericina A	Toba y col. (1991d)	
	<i>Lb. helveticus</i> LP27 481 1829	Lactocina 27 Helveticina J Helveticina V-1829	Upreti & Hinsdill (1973) Jeorger & Klaenhammer (1986) Vaughan y col. (1992)	
	<i>Lb. plantarum</i> A2 SIK-83 NCDO 1193 C-11 BN LPCO-10 MI406 UGI KW30 423	Lactolina Plantaricina SIK-83 Plantaricina B Plantaricina A Plantaricina BN Plantaricina S Plantaricina C Plantaricina 406 Plantaricina UG1 Plantaricina KW30 Plantaricina 423	Kodama (1952) Andersson (1986) West & Warner (1988) Daeschel y col. (1990) Lewus y col. (1991) Jimenez-Díaz y col. (1993) Jimenes-Díaz y col.(1995) Larsen y col. (1993,1995) Enan y col. (1996) Kelly y col. (1996) Van Reenen y y col. (1998)	
	<i>Lb. reuteri</i> LA6	Reurericina 6	Toba y col. (1991 ^a)	
	<i>Lb. sake</i> Lb 706 L45 LTH 673 MN	Sakacina A Lactocina S Sakacina p Bavarcina MN	Schillinger & Lücke (1989) Mortvedt & Nes (1990) Tichaczek y col. (1992) Kaiser & Monville (1996)	
	<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> H, E, F, M PAC 1.0 JD1-23 SJ-1 M UL5	Pediocina Ach Pediocina PA-1 Pediocina JD Pediocina SJ-1 Pediocina AcM Pediocina	Bhunja y col. (1987) González & Kunka (1987) Richter y col. (1989) Schved y col. (1993) Elegado y col. (1997) Goulhen y col. (1998)
		<i>P. pentosaceus</i> FBB-61 L-7230	Pediocina A	Etchells y col. (1964) Daeschel & Klaenhammer (1985)
		N5p	Pediocina N5p	Strasser de Saad & Manca de Nadra (1993)

GENERO	MICROORGANISMO PRODUCTOR	BACTERIOCINA	REPORTADA POR
Leuconostoc	<i>Leuc. Carnosum</i> Lm1 <i>Leuc. Gelidum</i> UAL 187	Leuconocina Lem1 Leucococina A-UAL 187	Yang y col.(1992) Hastings & Stiles (1991)
	<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> UL5 Y105 FR52	Mesenterosina 5 Mesenterosina Y105 Mesenterosina 52	Daba y col. (1991) Héchar d y col. (1992) Mathieu y col. (1993)
	<i>Leuc. paramesenteroides</i> OX	Leuconocina S	Lewus y col. (1992)
Carnobacterium	<i>C. psicola</i> LV17 LV61 UI49	Camobacteriocina A, B1 y B2 Psicolina 61 Camocina UI49	Ahn y Stiles(1990) Shillinger y col. (1993) Stolfels y col. (1992)
Streptococcus	<i>S. thermophilus</i> STB40 STB78 St10 SFI13 ACA-DC0040 CNCM I-1351	Bacteriocin STB40 Bacteriocin STB78 Bacteriocin St10 Termofilina 13 Termofilina T Termofilina 1 y 2	Smaczny y Kräner (1984) Smaczny y Kräner (1984) Cilano y col. (1990) Marciset y Mollet (1993) Aktypis y col. (1998) Germand y col.(1997)
Enterococcus	<i>E. faecalis</i> S-48 226	Bacteriocina Bc-48 Enterocina 226NWC	Lopez-Lara y col. (1991) Villani y col. (1993)
	<i>E. faecium</i> DPC 1146 No definido	Enterocina 1146 Enterocina A	Parente y Hill (1992) Aymerich y col. (1996)

Adaptado de De Vuyst y Vandamme, 1994.

bacteriocinas ya conocidas (Tabla 2). Las bacteriocinas que han superado los obstáculos mencionados existen en el mercado y se describen brevemente a continuación:

Nisina

La nisina es producida por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Esta formada por 34 residuos de aminoácidos y tiene un peso molecular de 3,510 Daltons (Delves-Broughton, 1990; Gross y Morell, 1971). Inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas, y particularmente las que producen esporas como *Bacillus* y *Clostridium* spp. (Jenson y col., 1994). Existen dos tipos de nisina (nisina A y nisina Z), cuya diferencia consiste en que la nisina A tiene histidina y la nisina Z tiene asparagina en la posición 27 de la cadena peptídica. Ambas tienen un espectro de actividad similar, aunque la nisina Z se difunde mejor en agar. Existen evidencias de que la nisina puede existir como dímero o tetrámero con pesos moleculares de aproximadamente 7,000 y 14,000 Daltons respectivamente (Delves-Broughton, 1998).

La nisina fue autorizada para su uso en alimentos por la FAO/WHO en 1969 y reconocida con el estatus GRAS por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en 1988. Inicialmente, la nisina fue patentada (Mattick y Hirsch, 1956). La nisina se usa en más de 50 países como conservador natural (Davis y col., 1999).

Tabla 2. Espectro de inhibición de algunas bacteriocinas

BACTERIOCINA	ESPECTRO DE INHIBICIÓN														
	MICROORGANISMOS PATOGENOS O ALTERANTES. DE LOS ALIMENTOS							BACTERIAS ACIDO LACTICAS(BAL)							
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Clostridium spp</i>	<i>Micrococcus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactopcccus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Carnobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
Nisina A	+	+	+	+	nr	+	nr	+	+	nr	+	+	nr	+	+
Nisina Z	+	+	+	+	nr	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+
Pediocina PA-1	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	nr	nr	nr	+
Bacteriocina WB1	+	+	+	+	nr	+	nr	+	nr	+	nr	nr	nr	nr	+
Lacticina 481	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	+	nr	+	+	+	+
Diplococina	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	nr
Lactostrepcinas	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	+	nr	nr	nr	+	nr
Lactococina A	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr	nr
Lactococina R	+	+	+	+	nr	+	+	+	+	+	nr	+	nr	+	+
Lactacina B	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Acidofulicina A	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Acidocina 8912	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Lactocina 27	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Helveticina J	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Helveticina V-1829	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Lactacina F	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	+
Brevicina 37	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	nr	nr	nr	+
Caseicina 80	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Curvacina A	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	+
Plantaricina A	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	+	+	+	nr	nr	+
Plantaricina 423	+	nr	nr	+	nr	+	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	nr
Plantaricina S	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	BAL							
Sakacina A	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	nr	nr	nr	+	+	nr	nr
Sakacina P	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Lactocina s	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	nr	nr	nr	+
Mesenterocina Y105	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr
Leucocina S	+	+	nr	+	nr	nr	nr	BAL							
Enterococina 1146	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+
Leucocina A-UAL-187	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	BAL							
Carnobacteriocin A&B	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	nr	+	+	nr	nr	+	nr	+
Leucocina A	+	nr	nr	nr	nr	nr	nr	BAL							

nr (no reportado)

+ inhibición del microorganismo

Pediocina PA-1

La Pediocina PA-1 es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* NRRL-B-18050 (González y Kunka, 1987); está conformada por 44 aminoácidos y tiene un peso molecular de 4,629 Daltons (Vanderburg, 1991). Inhibe el crecimiento de bacterias Gram positivas de los géneros *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Listeria*. Es utilizada en queso cottage, crema, ensaladas y carnes (Pucci y col., 1988).

2.1.1.1 Estructura

Las bacteriocinas producidas por BAL son, en general, moléculas cationicas y anfotéricas compuestas por residuos de 12 a 45 aminoácidos. Usualmente no presentan una estructura en solución acuosa pero son propensas a formar láminas α en presencia de solventes como trifluoroetanol, o en mezclas con micelas fosfolipídicas aniónicas (Moll y col., 1999).

2.1.1.2 Espectro de inhibición

Por definición las bacteriocinas son sustancias que actúan contra microorganismos taxonómicamente relacionados con los microorganismos productores. Por otro lado, es generalmente reconocido que las bacteriocinas no tienen efecto inhibitorio contra microorganismos Gram negativos debido a la presencia de la pared celular de estos últimos (Siragusa y col., 1993). Las bacteriocinas actúan contra microorganismos Gram negativos siempre y cuando se destruya o lesione la pared celular, mediante agentes quelantes como el EDTA

(ácido etilendiaminotetracético), alta presión hidrostática o algún otro mecanismo (Stevens y col., 1991; Kalchayanand y col., 1994).

Cada bacteriocina tiene un espectro de inhibición particular (Tabla 2). Las bacteriocinas con mayor potencial de aplicación en la industria alimentaria son aquellas que poseen un amplio espectro de inhibición. Para lograr esta amplitud, se han llegado a mezclar dos o más bacteriocinas (Requena y Peláez, 1995).

2.1.1.3 Clasificación de bacteriocinas

Las bacteriocinas de bacterias lácticas presentan diferencias en cuanto a peso molecular, espectro de inhibición, modo de acción, y propiedades bioquímicas. (Montville y Winkowski, 1997). Con base en dichas diferencias Klaenhammer en 1993, clasificó a las bacteriocinas de BAL en cuatro grupos: I. Lantibióticas, II. No lantibióticas, III. Termolábiles y IV. Bacteriocinas de estructura compleja. En estudios más recientes se propuso la eliminación del grupo IV y se modificaron los grupos I, II y III (Nes y col., 1996). La clasificación actualizada se presenta en la Tabla 3.

2.1.1.4 Unidades de actividad

La primera definición de unidad de actividad fue la "Unidad Reading" (UR), definida como la cantidad de nisina necesaria para inhibir una célula de *Streptococcus agalactiae* en 1 mL de caldo. Se llamó Unidad Reading en reconocimiento a que mucho del trabajo de investigación inicial de la nisina (1930-1960) se llevó a cabo en el Instituto Nacional de Investigación en Lácteos en Shinfield, Reading, Inglaterra. Posteriormente, la UR fue conocida como Unidad

Tabla 3. Clasificación de bacteriocinas (Klaenhammer, 1993; Nes y col. 1996).

CLASE*	GRUPO	ESTRUCTURA	CARACTERISTICAS	EJEMPLOS
I	Lantibióticas	Péptidos pequeños (menos de 5 KDa.)	Contienen en su estructura aminoácidos raros o atípicos como lantionina, β -metil lantionina. Nisina	
			Existen 2 tipos:	
			Tipo A. Péptidos alargados, catiónicos y forman poros. Algunos péptidos están formados por dos componentes.	Nisina A NisinaZ Lactosina S
			Tipo B. Péptidos con estructura globular, actúan contra enzimas y tienen actividad inmunológica.	Lacticina 481 Camocina UI49
II	No lantibióticas	Péptidos pequeños, termoestables de cadena corta (menos de 10KDa). No contiene lantionina.	Se subdividen en 4 subgrupos :	
			Ila. Péptidos antilistéricos con una secuencia N-terminal (Try-Gly-Ans-Gly-Val-Xaa-Cys)	Pediocina PA-1 Sakacina A Sakacina B Leucocina A Curvacina A
			Ilb. Bacteriocinas cuya actividad depende de la acción complementaria de dos péptidos	Lactococina G Lactococina M Lactacina F
			Ilc. Bacteriocinas que requieren residuos de cisteína para su actividad. Lactococina B	Enterococina P Divergisina A
			Ild. Bacteriocinas con un sistema de transporte secundario	Camobacteriocina A Enterococina B Plantaricina A
III	Proteínas termolábiles.	Peso molecular superior a 30 KDa.	Termolábiles	Helveticina V-1829 Helveticina J Acidofilucina A Lactacinas A y B

* Las bacteriocinas más estudiadas son las pertenecientes a las clases I y II debido a su abundancia en la naturaleza y su potencial de aplicación industrial.

Internacional (UI). Desde entonces, el Comité de Estandarización Biológica de la OMS (Organización Mundial de la Salud) estableció una preparación internacional de referencia que contiene 25 mg (1 millón de UI) de nisina pura por gramo (Delves-Broughton, 1998).

2.1.1.4.1 Unidades Internacionales

Las Unidades Internacionales (UI) se usan únicamente para nisina. La actividad de la nisina se mide de acuerdo al Estándar Británico BS4020: 1974 usando *M. luteus* ATCC10240 como microorganismo indicador.

2.1.1.4.2 Unidades arbitrarias

Las Unidades Arbitrarias (UA) se utilizan para todas las bacteriocinas que no sean nisina. Una UA se define como el recíproco de la dilución más alta a la que una muestra sigue exhibiendo actividad antibacteriana mediante el método conocido como el de fosas o el de pozos (Germond y col, 1997). Las UA varían dependiendo del medio, el indicador, el tamaño del pozo y la cantidad de muestra (Doyle y col, 1997) por lo que son comparables únicamente en el caso de que se utilice el mismo medio, el mismo indicador, el mismo tamaño de pozo y la misma cantidad de muestra.

2.2. Bacteriocina WB1

La bacteriocina WB1 es producida por *Lactococcus lactis* sbsp. *lactis* aislado de pozol de la zona de Altos de Chiapas por Cañas (1990).

El pozol es una masa preparada a base de maíz nixtamalizado que se consume disuelta en agua como bebida refrescante (Herrera y Ulloa, 1975). El pozol data de tiempos mayas y es consumido en la actualidad en Honduras (Briffin, 1997), en Nicaragua y en el sureste de México (Oaxaca, Campeche, Tabasco, Veracruz, Yucatán y Chiapas).

La bacteriocina WB1 pertenece al grupo IIa (Pereyra y Trejo, 1998), inhibe a *Listeria monocytogenes* (Tabla 2); es sensible a pronasa y no es inactivada por tripsina ni por α -quimiotripsina.

Los datos hasta ahora obtenidos para la bacteriocina WB1 resultan muy prometedores, en especial su actividad en medio líquido y su efecto antagónico contra *L. monocytogenes*. Sin embargo, quedan aún muchas dudas por esclarecer con respecto a esta bacteriocina. Es por ello que el presente estudio se concentra en la purificación de esta sustancia, en el marco de un proyecto integral que permita la caracterización completa de la bacteriocina WB1.

2.3 Purificación de bacteriocinas

La purificación de bacteriocinas, es una tarea difícil que requiere de protocolos específicos (De Vuyst y Vandamme, 1994). A excepción de un método "universal" para purificación de bacteriocinas de la clase IIa descrito recientemente (Berjeand y col., 1999), no existe una secuencia de purificación establecida para obtener bacteriocinas puras. Usualmente se toma como base la secuencia general de purificación de proteínas y se adapta de acuerdo a las necesidades y posibilidades de cada grupo de investigación (Tabla 4).

Convencionalmente la purificación de bacteriocinas se lleva a cabo por medio de una etapa inicial de precipitación, seguida de una etapa de separación por cromatografía en gel o en fase reversa (Humbert y col., 1998; Contreras y col., 1997; Miteva y col., 1998; Aktypis y col., 1998). En la actualidad existen otros métodos que involucran una etapa inicial de separación o purificación por adsorción—liberación específica (Yang y col., 1992; Yildirim y Johnson, 1998) o por cromatografía de inmunoafinidad (Suárez y col., 1997).

2.3.1 Etapa inicial: precipitación

Los métodos de separación se fundamentan en la diferencia de solubilidades que sufren las proteínas al ser expuestas a sales, solventes orgánicos, polímeros orgánicos, variaciones del pH y temperatura. Los más usados para la purificación de bacteriocinas son la precipitación por sales y por solventes orgánicos.

Las sales utilizadas para la precipitación de proteínas son generalmente el sulfato de amonio y el sulfato de sodio (Janson y Rydén, 1989; Voet y Voet, 1995).

Los solventes orgánicos utilizados comúnmente para la precipitación son aquellos que son miscibles en agua como el etanol y la acetona. Otro solvente que también se llega a utilizar es el cloroformo. La precipitación con solventes se lleva a cabo a bajas temperaturas (0°C) para evitar la desnaturalización de proteínas (Deuscher, 1990). Los métodos de precipitación más comúnmente utilizados para la purificación de bacteriocinas se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Métodos empleados en la secuencia de purificación de las bacteriocinas.

AUTOR	BACTERIOCINA	SECUENCIA DE PURIFICACION							ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
		Precipitación con sulfato de amonio	Extracción con Cloroformo y/o etanol, metanol	Cromatografía				Adsorción - liberación	
				Filtración en gel	Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa		
Kanatini Kazuo (1995)	Acidocina A	400 mg/ L	-	-	-	-	-	-	10
Joerger M. C. (1986)	Helveticina J	Buffer pH 5.3 con 6% de SDS	-	Sephadex G-22012	-	-	-	-	4
Jimenes Díaz Rufino (1995)	Pantaricina S	516g/L	-	-	Sepharosa Catiónica	Fenil-sepharosa	Líquida C2/C18	-	91.6
Kaiser Alan L (1996)	Bavaricina MN	60% saturación	-	-	Sepharosa Q (aniónico) Sepharosa SQ (catiónica)	-	-	-	10.7
Aymerich Teresa (1996)	Enterocina A	400g/l	-	-	S sefarosa cationica	-	Ne	-	51.3
Contreras B. G. L. (1997)	Lactobina A	35% Saturación	Cloroformo/ metanol (1:2)	-	-	-	Fenil-sepharosa HR 5/5	-	0.069

AUTOR	BACTERIOCINA	SECUENCIA DE PURIFICACION							ACTIVIDAD RECUPERADA (%)
		Precipitación con sulfato de amonio	Extracción con cloroformo y/o etanol, metanol	CROMATOGRAFIA				Adsorción- liberación	
				Filtración en gel	Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa		
Van Reenen C. A. (1998)	Plantaricina 423	-	13% de cloroformo	-	-	-	Fenilsepharosa H/R 5/5	-	-
Meghrous J. (1997)	Nisina Z	60% saturación	-	-	-	-	Ultrasfere ODS	-	3.6
Hubert E. (1998)	Bacteriocina PsVP-10	-	-	Fosfocelulosa	-	-	-	-	64
Miteva V. (1998)	Bacteriocina producida por Lactobacillus delbruckii 1043	Ne	-	-	-	-	Ne	-	17
Aktypis A. (1998)	Termofilina T	55%	-	Sephadex G-150	Aniónica	-	-	-	3
Elegado (1997)	Pediocin AcM	-	-	-	-	-	-	Adsorción pH6/lib. NaCl pH 2	90
Yildirim Z. (1998)	Lactococina R	-	-	-	-	-	-	Ajustando el pH del medio de cultivo a rangos de 3-9 centrifugando y resuspendiend o en NaCl pH 2	50

Ne - condiciones no especificadas

- El método no se utilizó

2.3.2 Etapa de separación o purificación

La etapa de separación o purificación de las bacteriocinas puede llevarse a cabo mediante métodos de cromatografía o por el método de adsorción-liberación específica (Muñoz, 1981; Voet y Voet, 1995; Janson y Rydén, 1989; Scopes, 1994).

2.3.2.1. Adsorción-Liberación específica

El método de adsorción-liberación específica se fundamenta en los estudios de Bhunia (1991) quién observó que dependiendo del pH del medio de cultivo la Pediocina AcH se adhería a su célula productora. Se observó además que la máxima adsorción ocurría a pH 6.0-6.5 y que a pH menor o igual a 2 no se llevaba a cabo adsorción alguna. Aunque no se conoce el principio fisicoquímico de este fenómeno, dicha propiedad se ha utilizado para la purificación de bacteriocinas (Yang, 1992; Elegado y col., 1997; Yildirim y Johnson, 1998). El método consiste en modificar el pH del medio de cultivo a un valor que promueva la adsorción de la bacteriocina a la célula productora y posteriormente resuspender las células en buffer a un valor de pH que propicie la liberación de la bacteriocina (Figura 1). Los valores de recuperación de bacteriocina reportados varían de un 50% a un 90% (Tabla 4).

2.3.3. Etapa final: Diálisis y Liofilización.

Al final de la fase de separación inicial, las fracciones de la muestra usualmente contienen sales. Las sales provienen del eluyente, en el caso de la cromatografía o del buffer de liberación, en el caso de adsorción-liberación específica. Dichas

sales pueden intervenir con estudios subsecuentes, de manera que es necesario eliminarlas de la muestra. Esto se lleva a cabo mediante un procedimiento de diálisis (Deutscher, 1990), y finalmente la muestra es concentrada y secada por medio de un proceso de liofilización.

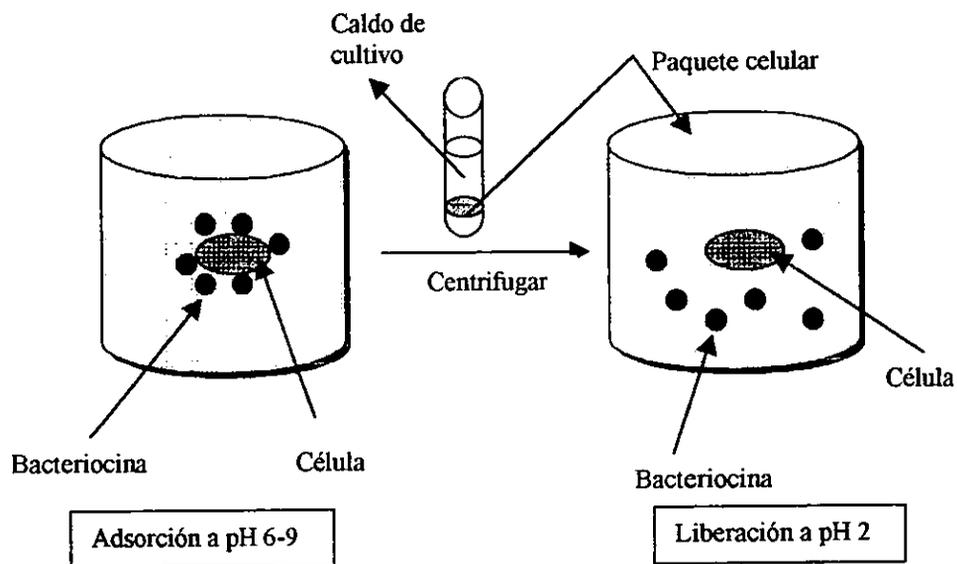


Figura 1. Diagrama del método de adsorción-liberación

2.4 Determinación del peso molecular

La determinación del peso molecular de las bacteriocinas se hace, de acuerdo a Shägger y Von Jagow (1987), utilizando una electroforesis con gel de poliacrilamida (PAGE) y dodecil sulfato de sodio (SDS). Dicha electroforesis fue inicialmente usada para separar proteínas de peso molecular de un rango de 1 a 100 KDa, por lo tanto es utilizada con éxito por numerosos grupos de investigación para realizar estudios de bacteriocinas (Kanatani y col., 1995; Kaiser y col., 1996; Aymerich y col., 1996).

2.4.1 Identificación de las bandas con actividad

Para identificar la banda que corresponde a una bacteriocina después de separar la muestra por SDS-PAGE se utiliza la mitad del gel sin teñir con el azul de coomasie. El método consiste en colocar dicha mitad del gel en una caja Petri estéril y agregar una sobrecapa de agar que contiene al microorganismo indicador. Después de un período de incubación, se espera la aparición de halos de inhibición del crecimiento alrededor de las bandas que corresponden a las bacteriocinas (Figura 2) (Yildirim y Johnson, 1998; Humbert y col., 1998).

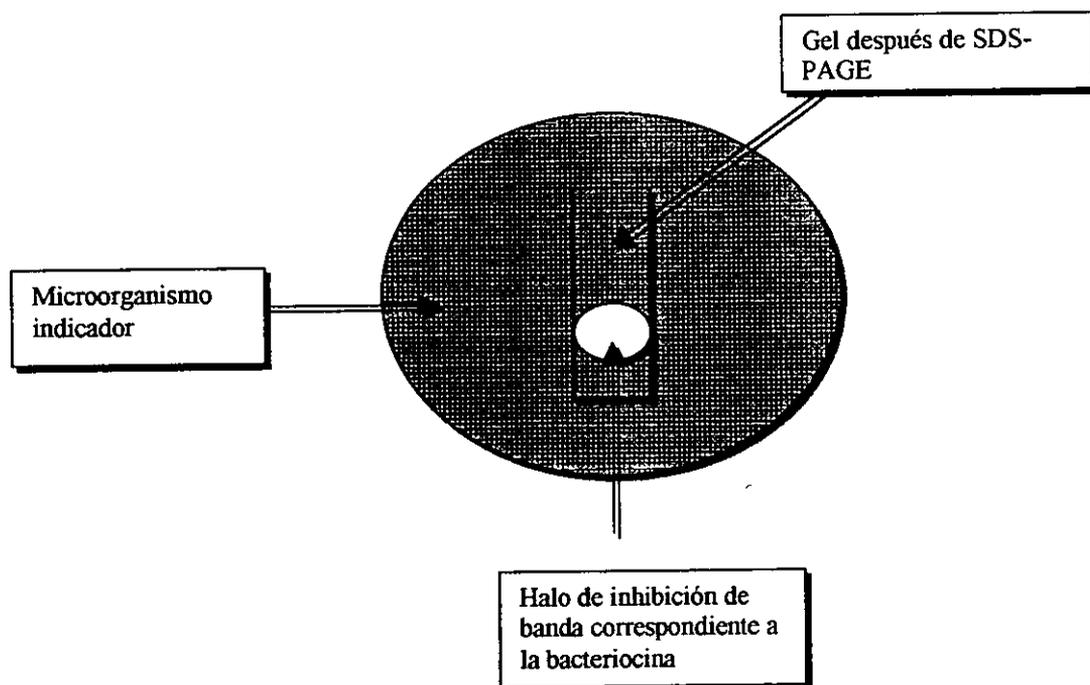


Figura 2. Identificación de bandas correspondientes a una bacteriocina en SDS-PAGE sin teñir

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Determinar la utilidad del método de adsorción-liberación para la purificación de la bacteriocina WB1.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el peso molecular de la bacteriocina WB1
2. Seleccionar un medio de cultivo para la producción de la bacteriocina WB1
3. Establecer las condiciones de crecimiento adecuadas para determinar actividad utilizando a *Micrococcus luteus* como microorganismo indicador
4. Estudiar la producción de la bacteriocina WB1 durante el crecimiento de *Lactococcus lactis* y relacionarla con los cambios de pH a lo largo de la fermentación
5. Establecer los tiempos y condiciones óptimos de adsorción y de liberación de la bacteriocina WB1
6. Determinar el efecto del proceso de diálisis sobre la actividad de la bacteriocina WB1
7. Determinar la influencia del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Medios de cultivo y soluciones

4.1.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados fueron los siguientes: Caldo MRS (Oxoid CM-359); Caldo APT (BBL 10918); Medio APT semisólido [caldo APT adicionado con 0.2% de agar bacteriológico (Bioxon C150-1) y 5 mg de CaCO_3]; Agar assay 1% (g/L: peptona bacteriológica (Oxoid L37) 10; extracto de carne (Bioxon 160) 3; NaCl 3; extracto de levadura (Difco 0127-179) 1.5; azúcar mascabado (Dilis) 1 y agar bacteriológico (Bioxon C150-1) 10), pH 7.5); Agar assay 0.8% (g/L: la formulación anterior con 8 g de agar) pH 7.5; Caldo soya tripticasa (CST) de las siguientes marcas: BBL 1768, Bioxon 111-1, Oxoid CM-129; CST-A preparado por ingredientes: (g/l: Triptona (Oxoid L42) 17; peptona bacteriológica (Oxoid L37) 3; cloruro de sodio 5; fosfato dipotásico 2.5); CST-B (CST-A con 0.25% de glucosa); CST-C (CST-A con 0.25% glucosa más 0.5% de extracto de levadura (Difco 0127-17)) y CST-C80 (CST-C con 0.2% de tween 80).

4.1.2 Soluciones

Las soluciones utilizadas fueron las siguientes: Solución Ringer (g/L: NaCl 9; KCl 0.42; CaCl_2 anhidro 0.24 y NaHCO_3 0.20); Solución Ringer ¼: A una parte de la solución Ringer se le adicionaron 3 partes de agua destilada.

4.2 Microorganismos

Las cepas utilizadas fueron:

- a) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* aislada de pozol indígena de la zona Altos de Chiapas y caracterizada por MIDI LABS (Newark, USA) con base en la similitud de su secuencia genética 16SrRNA.
- b) *Micrococcus luteus* ATCC 10420 donada por B. García, Posgrado de Alimentos, Universidad Autónoma de Querétaro.

4.2.1 Conservación de cepas

- a) *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Fue mantenida a -70°C en chaquiras preparadas en caldo nutritivo con glicerol como crioprotector.
- b) *Micrococcus luteus*. Fue mantenida a -20°C en chaquiras preparadas en una solución de leche descremada al 10% con glicerol como crioprotector.

4.2.2 Cultivos de trabajo

- a) El cultivo de trabajo de *Lactococcus lactis* se preparó en agar APT semisólido de la siguiente manera: Se transfirió una chaquira que contenía la cepa a 3 ml de caldo ATP. Después de 24 h de incubación a 30°C , se transfirió una asada de este cultivo a 3 mL de caldo APT incubando 24 h a 30°C . De éste, se inoculó un tubo con agar APT semisólido dejándose en incubación durante 24 h a 30°C . El cultivo se mantuvo a 4°C por un periodo máximo de 60 días.
- b) El cultivo de trabajo de *M. luteus* utilizado fue el mismo cultivo descrito en el inciso 4.2.1.

4.2.3 Preparación de inóculos

- a) El inóculo de *L. lactis* se preparó a partir del cultivo de trabajo. Se llevaron a cabo experimentos para seleccionar un medio de cultivo para la preparación del inóculo (Figura 3). Una vez seleccionado dicho medio, el inóculo de *L. lactis* para la producción de la bacteriocina WB1 se preparó como se describe en la Figura 4.
- b) El inóculo de *M. luteus* se preparó a partir del cultivo de trabajo como se indica en la Figura 5.

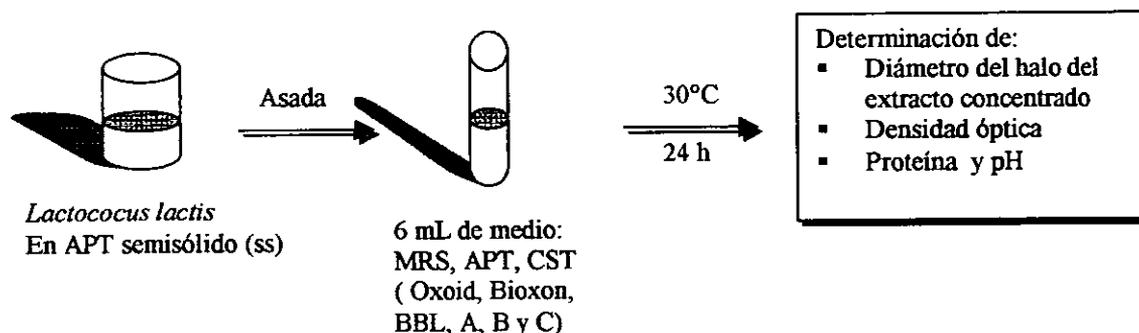


Figura 3. Diagrama de flujo para la selección del medio de cultivo para la preparación del inóculo de *L. lactis*.

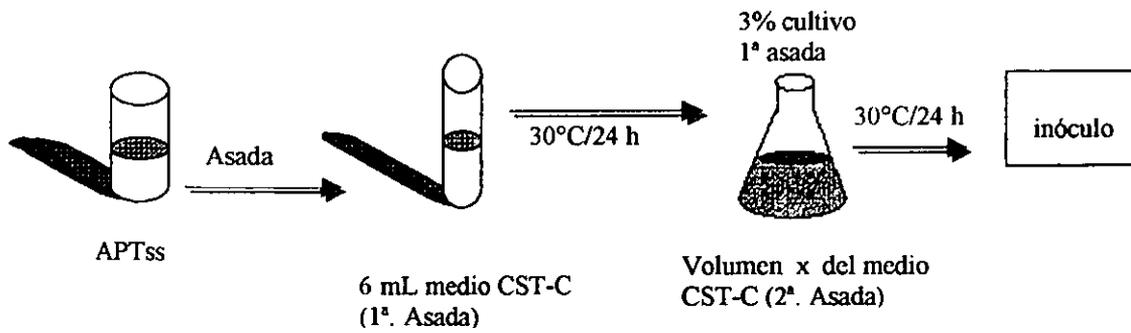


Figura 4. Preparación de inóculo para la producción de bacteriocina WB1

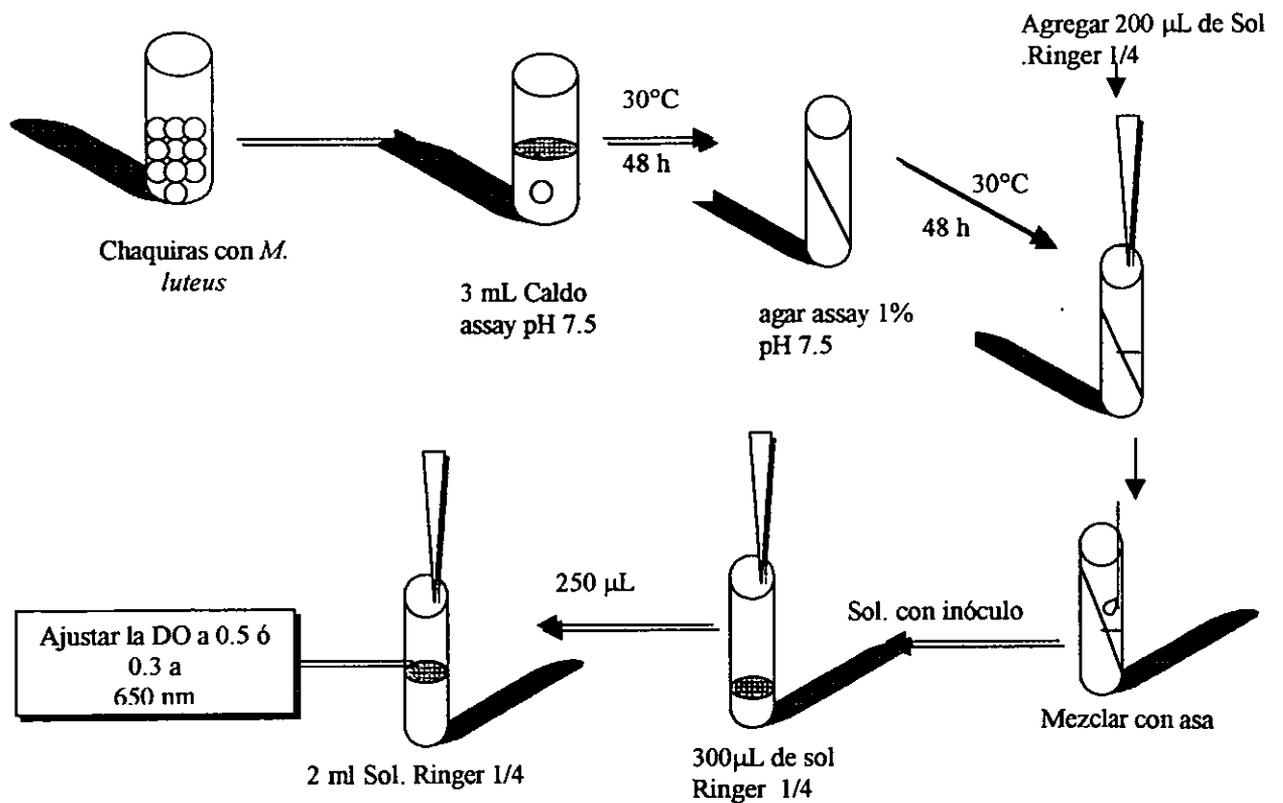


Figura 5. Preparación del inóculo de *M. luteus*

4.3 Producción de la bacteriocina WB1

Las fermentaciones de *L. lactis* para producir la bacteriocina WB1 se llevaron a cabo en matraces Erlenmeyer trabajando con volúmenes de 100 a 1500 mL de medio CST-C. El medio fue adicionado con 3% de inóculo de *L. lactis* e incubado a 30° por 24 h.

4.3.1 Cinética de crecimiento

Durante el crecimiento de *L. lactis* a 30°C se tomaron muestras cada hora durante las 12 primeras horas y a la hora 24. Se determinó la densidad óptica (DO) a 550 nm, el pH y la actividad de la bacteriocina WB1 en cada muestra. Los experimentos se realizaron por triplicado.

4.3.2 Determinación de biomasa

La biomasa se determinó a partir de la DO de acuerdo al método descrito por Rodés (1997) (Apéndice 1) de acuerdo a la siguiente ecuación ($r = 0.9998$):

$$\text{Biomasa} = \frac{\text{DO}_{550\text{nm}} - 0.0526}{0.9881}$$

4.4 Determinación de actividad

La determinación de la actividad se llevó a cabo por el método de fosas con base en el método estándar británico BS4020:74, como se describe a continuación:

4.4.1 Preparación del extracto libre de células (ELC)

Después de la producción de la bacteriocina, las muestras obtenidas fueron calentadas a 70°C por 30 minutos para evitar una posible inactivación de la bacteriocina por la acción de enzimas proteolíticas. Posteriormente, se centrifugó el medio de cultivo durante 15 min. a 10, 000 r.p.m. a 4°C ó temperatura ambiente. Se separó el sobrenadante que contenía a la bacteriocina. Se determinó el pH del extracto y se ajustó a un valor de 6.5 adicionando NaOH 1M ó HCl 1M. Finalmente, el extracto se esterilizó por filtración utilizando membranas de 0.45 μm ó 0.2 μm . El extracto se almacenó en tubos Eppendorf a temperatura ambiente por un máximo de 12 h hasta su utilización.

4.4.2 Preparación de cajas con *M. luteus*

Se realizaron experimentos previos para asegurar que la inhibición de *M. luteus* fuera causada únicamente por la bacteriocina WB1 para lo cual se estudió la influencia del pH y la temperatura en el crecimiento de *M. luteus*. Se monitorearon 3 temperaturas de inoculación (50, 45 y 40°C) con 3 concentraciones de *M. luteus* (concentrada, solución diluida y solución DO ajustada). Las cajas se incubaron a 30°C por 24h. Se determinó el porcentaje de cajas que presentaron crecimiento de *M. luteus* a las diferentes concentraciones y temperaturas de inoculación. Para determinar la influencia del pH se ajustó el medio assay 0.8% a valores de 5.5, 6.5, 7.5 y se inocularon 20 μL de la solución ajustada (DO 0.5) de *M. luteus*. Las placas se incubaron a 30°C por 24 h. Los experimentos se hicieron por duplicado.

Una vez establecidas las condiciones para el crecimiento de *M. luteus*, se prepararon las cajas para determinar la actividad (Figura 6).

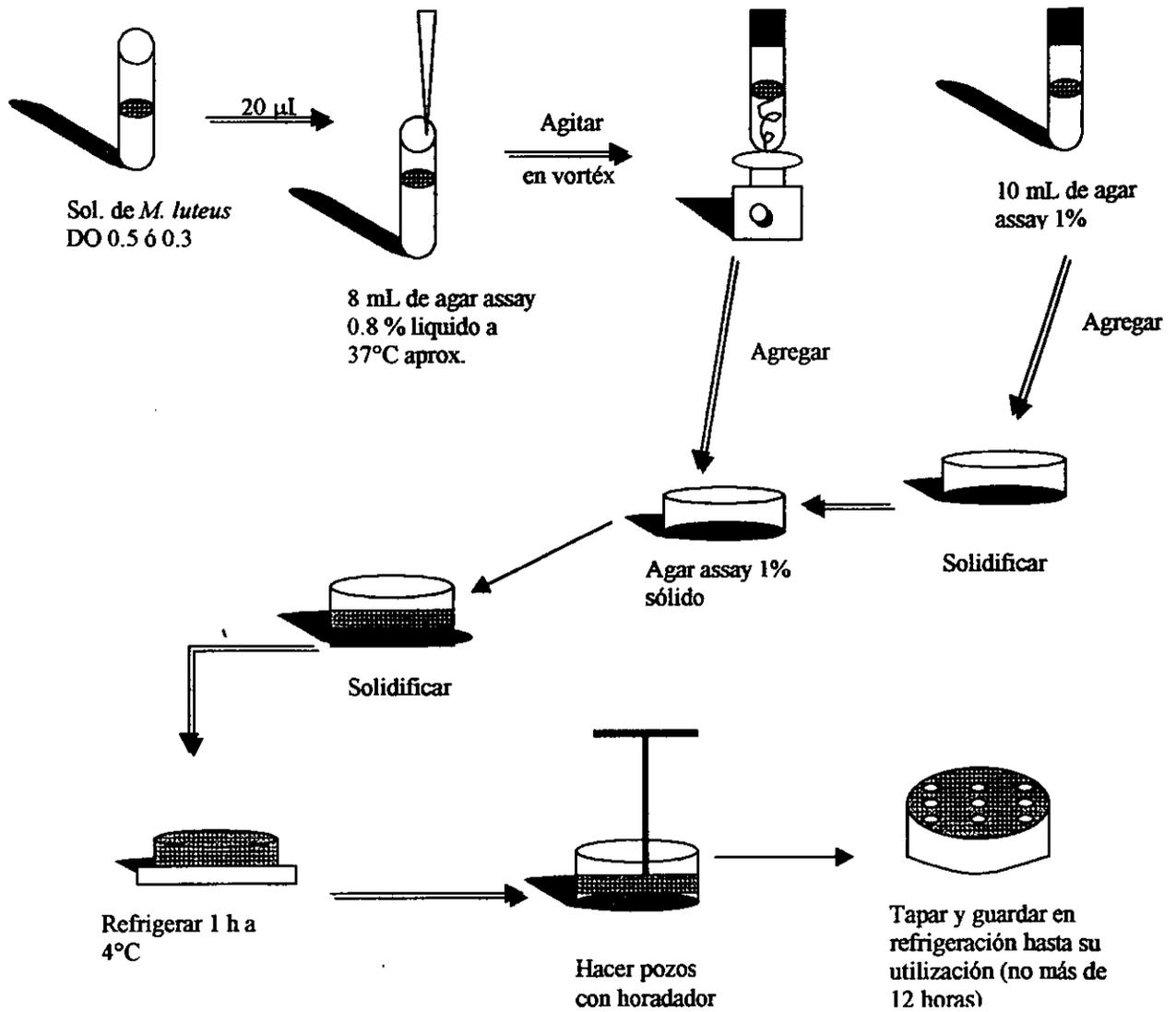


Figura 6. Preparación de *M. luteus* para determinación de actividad

4.4.3 Cuantificación de actividad

Se realizaron diluciones seriadas de dos en dos (1/2, 1/4, 1/8, etc.) del ELC. Se tomaron 20 μL del extracto y de las diluciones correspondientes y se colocaron en cada una de las fosas por triplicado para cada dilución. Se dejó secar la muestra en las fosas durante 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron las cajas en posición invertida por 24h a 30°C. Transcurrido este tiempo se midió el diámetro de los halos de inhibición con regla o Vernier.

La actividad se determinó en unidades arbitrarias de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{UA/mL} = (\text{RDM}/20\mu\text{L})(1000 \mu\text{L/ mL})$$

Donde:

UA = Unidades arbitrarias

RDM= Recíproco de la dilución máxima que presentó halo de inhibición de 1 mm al menos

4.5 Determinación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (Bio-Rad C500-0006). Este método se basa en una reacción colorimétrica que se lleva a cabo entre una solución ácida del colorante azul brillante de Coomassie G-250 (disponible comercialmente Bio-Rad C500-0006) que reacciona principalmente con los residuos de aminoácidos básicos y aromáticos, especialmente arginina. Como resultado de dicha reacción, se produce un cambio de color (de café rojizo a azul) cuya intensidad se determina por densidad óptica a 595 nm. La

concentración de proteínas se cuantifica interpolando la densidad óptica obtenida en la muestra en una curva patrón, mediante una ecuación de regresión lineal. El rango de detección de proteína por este método va de 1 a 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$

La curva patrón se elaboró de acuerdo a las instrucciones del proveedor del reactivo de Bradford (Bio-Rad I-800-424-6723). Se utilizó una solución stock de Albúmina Bovina (GIBCO BRL C11018-025) con una concentración de 10 mg/mL , a partir de la cual se hicieron diluciones para tener concentraciones entre 1.25 a 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La curva patrón obtenida (Apéndice 2) se utilizó para calcular la cantidad de proteína de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Proteína } (\mu\text{g}/\text{mL}) = \frac{\text{DO}_{595\text{nm}} - 0.0158}{0.04554}$$

4.5.1 Preparación de muestras para la determinación de proteínas

Las muestras procedentes del medio de cultivo, buffer de liberación y buffer de lavado se prepararon de la misma manera que el inciso 4.4.1. Las muestras procedentes de soluciones dializadas sólo fueron filtradas utilizando membranas de 0.45 o 0.2 μm . Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente por un máximo de 24 h para su posterior análisis.

4.5.2 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo utilizando 800 μL de muestra adicionados con 200 μL del reactivo de Bradford. La mezcla se agitó con un vortéx

y se dejó reposar durante 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se leyó la DO a 595 nm y los valores obtenidos se sustituyeron en la ecuación descrita anteriormente. Las determinaciones se realizaron por duplicado para cada una de las muestras analizadas.

4.6 Purificación por el método de adsorción-liberación

4.6.1 Adsorción

Se estudiaron las condiciones óptimas de pH y tiempo de adsorción de la bacteriocina WB1 después de la fermentación de *L. Lactis*. Los valores de pH estudiados fueron: 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y los tiempos de adsorción probados fueron: 2, 3, 6, 9 y 24 h a un pH de 8.5 (Figura 7A). El grado de adsorción se determinó mediante la medición del halo de inhibición en la dilución 1:4. Los experimentos se realizaron por duplicado.

4.6.2 Liberación

Una vez realizada la adsorción, las células fueron separadas del medio de cultivo por centrifugación. La liberación se llevó a cabo resuspendiendo las células de *L. lactis* en un buffer de NaCl 100 mM a un pH 2.0. Para establecer el tiempo óptimo de liberación se probaron tiempos de 1, 2, 3, 6, 9 y 24 h (Figura 7B). El grado de liberación de la bacteriocina WB1 se determinó realizando pruebas de actividad en extractos del buffer de liberación mediante la medición del halo de inhibición en la dilución 1:4. Se determinó, así mismo, la concentración de proteína en el buffer. Se estudió la liberación previa adsorción y sin adsorción (Figura 7C). Los experimentos se realizaron por duplicado.

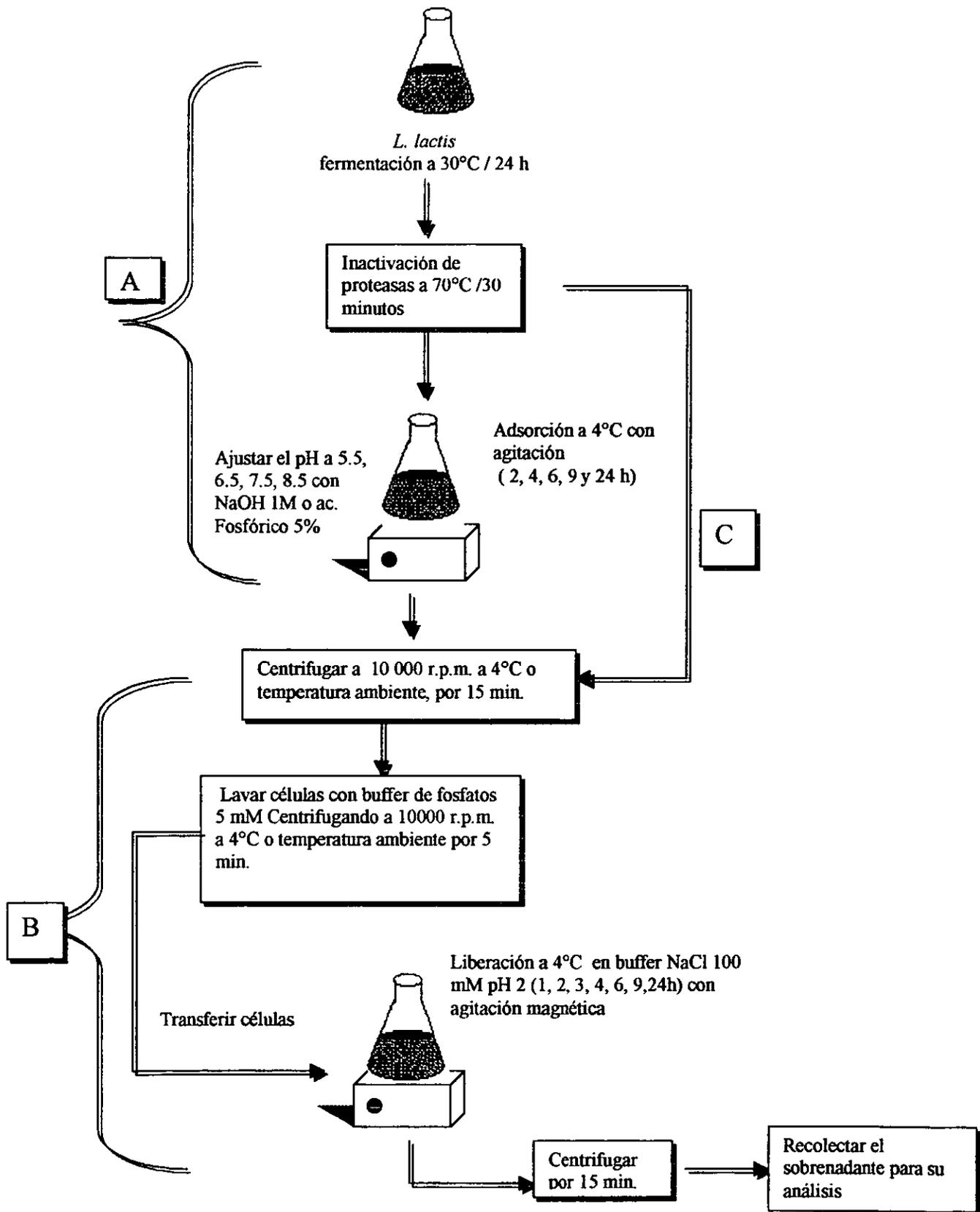


Figura 7. Diagrama de adsorción-liberación para la bacteriocina WB1

4.7 Concentración de la bacteriocina

4.7.1 Diálisis

Para llevar a cabo la diálisis se fermentaron volúmenes de 1000 y 1500 mL por 24 h (Figura 7C). Las células separadas por centrifugación fueron resuspendidas en buffer de NaCl 100mM a pH 2, en un volumen 1:20 por un lapso de 6 horas a 4°C con agitación magnética. Transcurrido este tiempo, se colocaron volúmenes de 25 a 50 mL de buffer en una membrana de diálisis de punto de corte de 1000 (Spectra/por Cat. 132 640). Se dializó a 4°C durante 36 a 48 horas con agitación magnética contra agua, cambiándola de 6 a 8 veces. Finalizando la diálisis se determinó actividad y cantidad de proteína en las muestras.

4.7.2 Liofilización

Después de la diálisis, las muestras fueron filtradas en condiciones estériles y posteriormente congeladas en volúmenes de 6 mL a -70°C para su liofilización.

La liofilización se realizó por un período de 24 horas. Transcurrido este tiempo, se resuspendieron las muestra en un volumen conocido de agua ó buffer, para determinar la actividad residual.

4.8 Efecto del Tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina

WB1

Para determinar el efecto que el tween 80 pudiera ejercer en el proceso de producción y purificación de la bacteriocina, *L. lactis* fue cultivado en volúmenes de 1500 mL en medio CST-C80 que contiene tween 80 (0.2%). Se realizó la purificación de la bacteriocina producida por el método de adsorción y liberación

específica. Posteriormente, la muestra fue dializada y liofilizada. En cada paso se monitoreó la actividad y la cantidad de proteína. Se realizó un experimento en las mismas condiciones pero sin tween 80. Cada experimento se realizó por duplicado.

4.9 Determinación del peso molecular de la bacteriocina

Electroforesis

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE utilizando geles de poliacrilamida de 16.5%, 18% (Shägger & Von Jagow, 1987) y geles de 12% (Short protocols for protein purification). Se utilizaron también geles de gradiente de 12%-19% (Laemmli, 1970). Se usaron estándares de peso molecular de un rango de 26.625 a 1.423 KDa (Bio-Rad Cat. No. 161-0326). Después de la electroforesis, el gel se dividió en dos partes; una de ellas se tiñó con azul de Coomasie G-250 y la otra se utilizó para la posterior identificación de bandas con actividad mediante la realización de un zimograma.

4.10 Identificación de bandas con actividad

La identificación de bandas con actividad se llevó a cabo mediante la realización de zimogramas. Una parte del gel sin teñir se cortó en fracciones de aproximadamente 5mm. Dichas fracciones se numeraron y colocaron en cajas Petri con una base de agar assay 0.8% conteniendo un inóculo de *M. luteus*. Una vez colocadas las fracciones sobre el agar, se cubrieron con una sobrecapa de agar assay 0.8% inoculado igualmente con *M. luteus*. Las cajas se incubaron a

30°C durante 24h. Transcurrido este tiempo se determinó la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de las fracciones estudiadas.

V. RESULTADOS

5.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento de *L. lactis*

Se probaron los medios de cultivo: MRS, APT, CST de las marcas Bioxon, Oxoid, BBL, y CST preparado por ingredientes (A, B, C). Se midió la densidad óptica (DO), el pH, el diámetro del halo de inhibición en el extracto concentrado y el contenido de proteínas de cada medio de cultivo utilizado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.

5.2 Influencia del pH y temperatura en el crecimiento de *M. luteus*

ATCC10320

Debido a que *M. luteus* se utiliza como microorganismo indicador de la actividad de la bacteriocina WB1, se realizaron experimentos, para asegurar que la inhibición de este microorganismo fuera causada únicamente por la bacteriocina. Se estudió el efecto de la temperatura de inoculación y el efecto del pH del medio en el crecimiento de *M. luteus*. Los resultados se muestran en la Figura 8 y la Figura 9.

5.3 Crecimiento y producción de bacteriocina por *Lactococcus lactis* en

medio CST-C

La curva de crecimiento donde se puede observar la relación de biomasa, pH y producción de la bacteriocina WB1 a lo largo de la fermentación *Lactococcus lactis* se presenta en la Figura 10.

Tabla 5. Crecimiento de *L. lactis* y producción de bacteriocina WB1 en diferentes medios de cultivo

Medio	DO(550nm)	pH			Diámetro del halo (mm) ^a	proteína (µg/mL)				
		inicial	final	Δ		inicial	Final	Δ	%Error	
									L5	>L5
MRS(Oxoid)	1.312	6.09	4.34	-1.75	17	50.26	48.23	-2.03	0.31	12.03
APT(BBL)	1.804	6.76	4.36	-2.40	20	27.29	26.57	-0.72	3.82	40.00
CST(Bioxon)	0.783	6.99	6.33	-0.66	12	19.72	25.03	5.31	6.11	2.08
CST(Oxoid)	1.332	7.26	5.56	-1.71	15	12.26	14.10	1.84	5.77	26.22
CST(BBL)	1.232	7.29	5.65	-1.65	14	13.44	15.27	1.84	8.17	300.70
CST-A	0.481	7.03	6.84	-0.19	14	24.36	20.86	-3.49	3.94	45.82
CST-B	1.038	7.26	5.69	-1.58	17	26.15	23.88	-2.27	3.05	14.61
CST-C	1.340	7.18	5.27	-1.91	17	19.97	24.47	4.50	0.57	10.63

Los resultados reportados son el promedio de dos determinaciones, donde cada determinación difirió menos del 2% del promedio, excepto para proteínas.

a = Diámetro del halo de inhibición del extracto concentrado, incluyendo el diámetro del pozo (5 mm)

DO = Densidad óptica del cultivo después de 24 h de fermentación a 30°C

L5 = Método de Bradford, lectura a los 5 minutos

>L5 = Método de Bradford, lecturas después de 5 minutos.

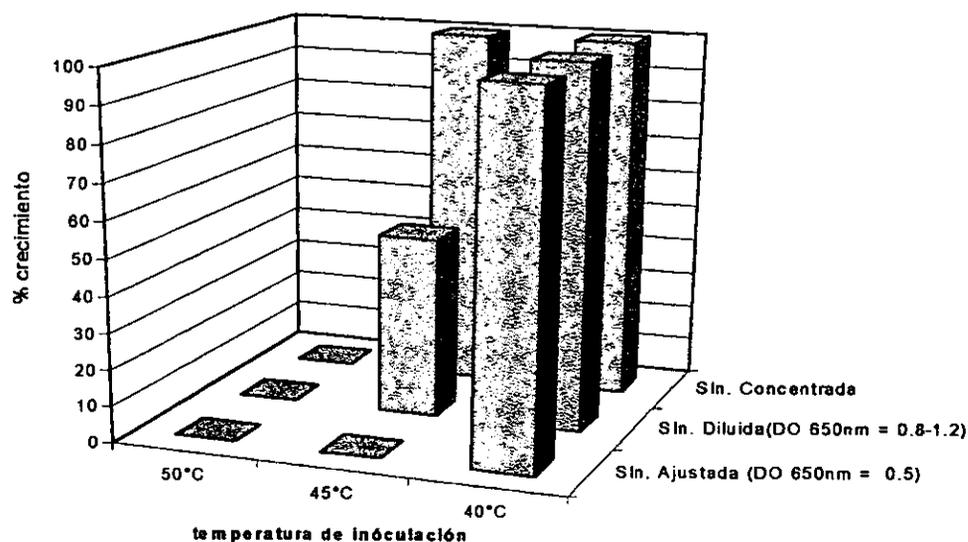


Figura 8. Efecto de la temperatura de inoculación en el crecimiento de *M. luteus* en agar assay 0.8%. Se observa que 40°C es la temperatura óptima de inoculación ya que permite el crecimiento de *M. luteus* en las tres concentraciones.

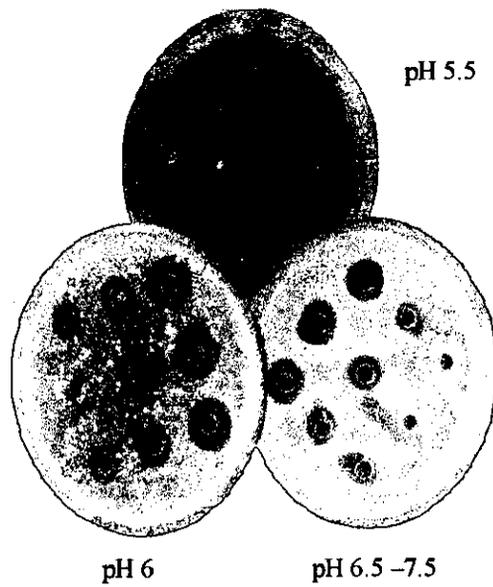


Figura 9. Efecto del pH en el crecimiento de *M. luteus* ATCC10420. Se observa que a pH 5.5 no hay crecimiento, a pH 6.0 el crecimiento es irregular y a pH 6.5-7.5 el crecimiento es óptimo.

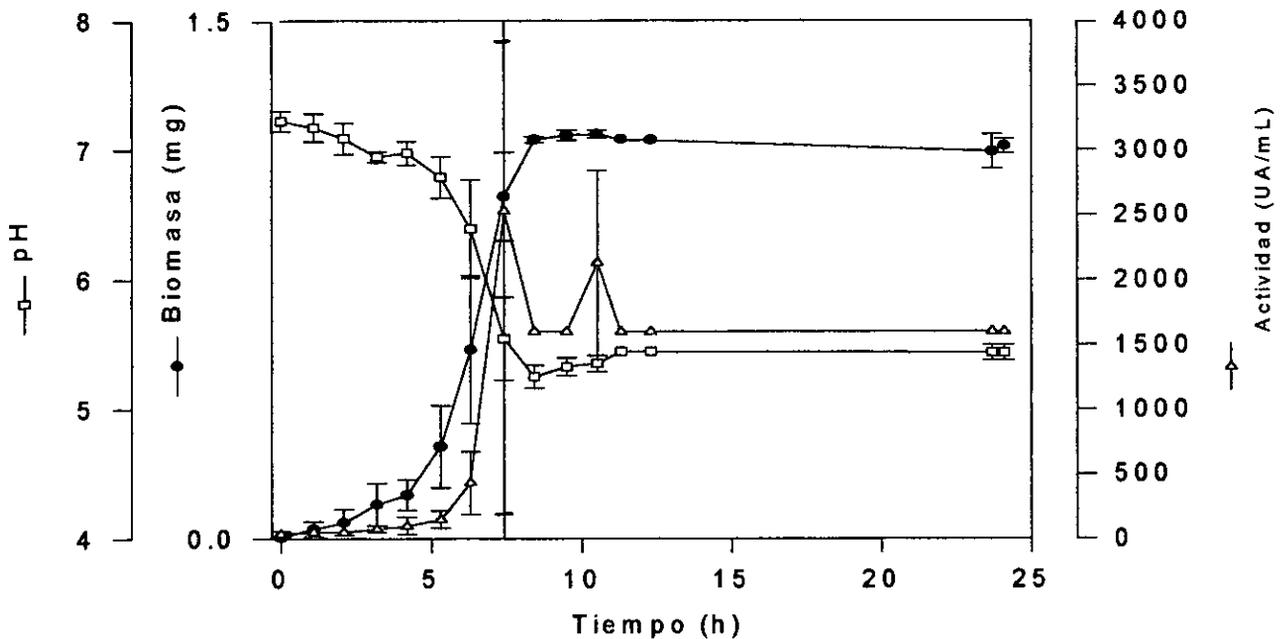


Figura 10. Curva de crecimiento de *L. lactis* en medio CST-C a 30°C, donde se muestra la relación Biomasa (●), pH (□) y producción de bacteriocina (Δ). Los resultados son el promedio de tres determinaciones donde las barras indican la desviación estándar.

5.4 Purificación por el método de adsorción-liberación

La adsorción de la bacteriocina WB1 a las células de *L. Lactis* se estudió a los siguientes valores de pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.5. Inmediatamente después de la adsorción se llevo a cabo la liberación a pH 2. Los resultados se muestran en la Figura 11 y Figura 12.

Se estudio el efecto del tiempo en la adsorción a pH 8.5. Los resultados se muestran en la Tabla 6. Así, mismo se presentan los resultados del efecto del tiempo en la liberación de la bacteriocina (Tabla 7).

5.5 Cambio de la actividad durante el proceso de diálisis

Una vez contenida en el buffer de liberación, la bacteriocina WB1 fue sometida a un proceso de diálisis. Los cambios presentados en la actividad de la bacteriocina WB1 durante este proceso se muestran en la Tabla 8.

5.6 Efecto del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1

Con objeto de conocer el efecto que el tween 80 pudiera ejercer en el proceso de producción y purificación de la bacteriocina WB1, se llevó a cabo una fermentación en la que se utilizó el medio CST-C80. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

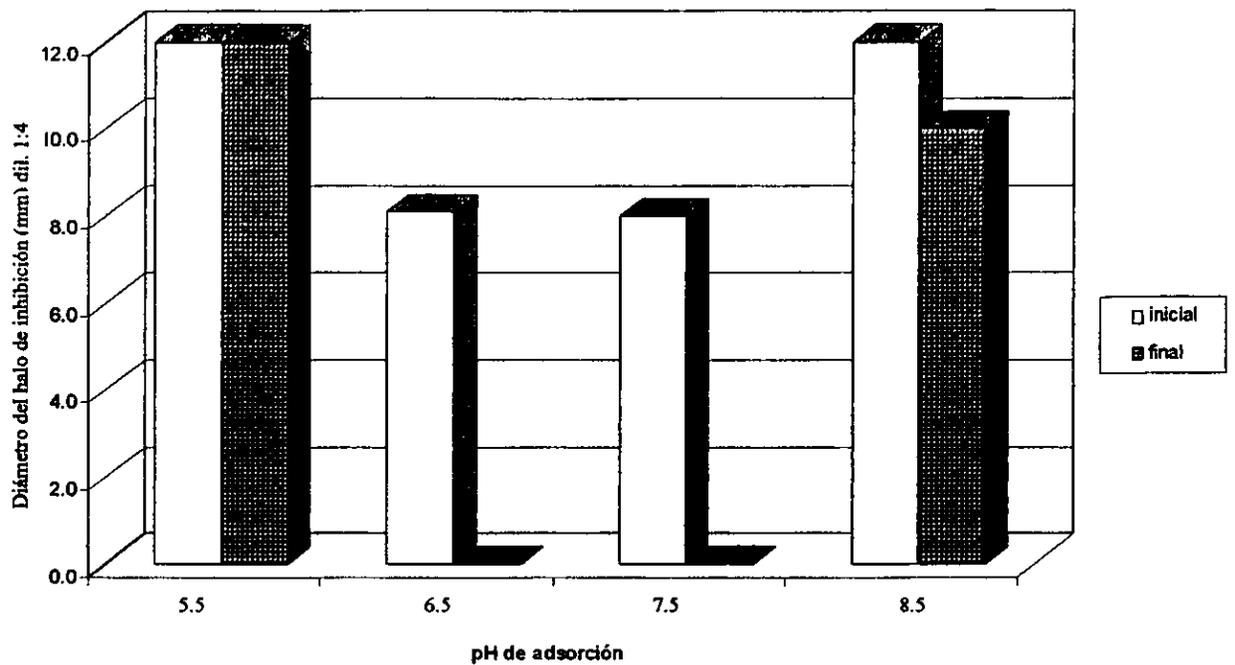


Figura 13. Adsorción de la bacteriocina WB1 a las células de *L. lactis* en medio de cultivo CST-C a diferentes valores de pH. Se observa que la bacteriocina WB1 se adsorbe a pH 6.5 y 7.5.

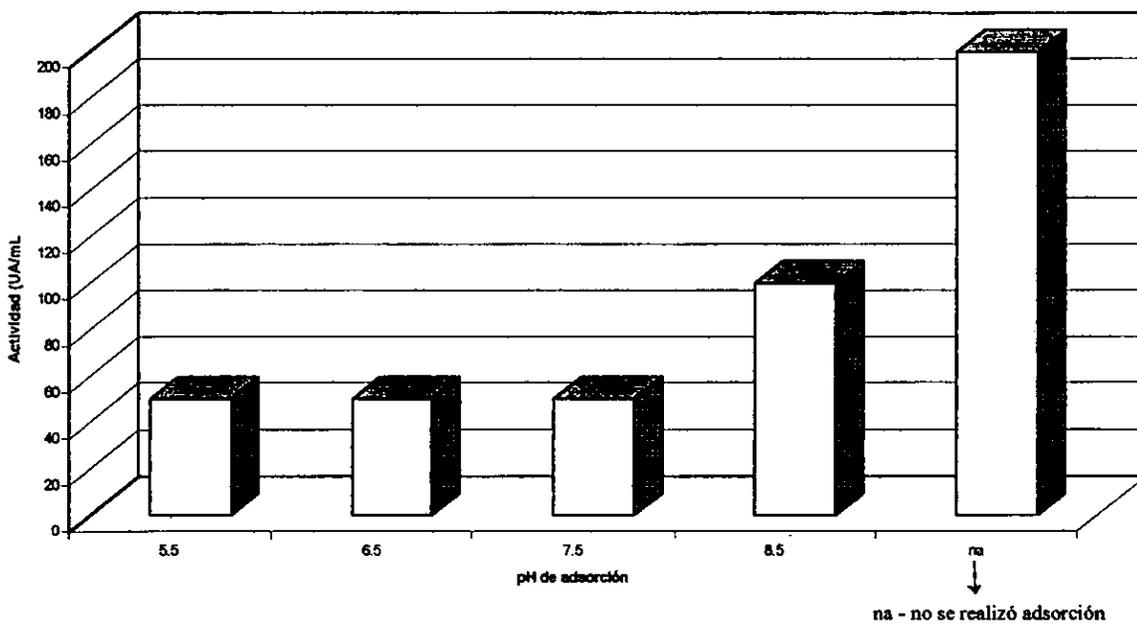


Figura 12. Liberación de la bacteriocina WB1 en buffer de NaCl 100 mM pH 2. Se observa que se adsorbe mayor cantidad de bacteriocina (200 UA/mL) cuando no se realizó adsorción que cuando se adsorbió a pH 5.5, 6.5, 7.5 y 8.5.

Tabla 6. Adsorción de la bacteriocina WB1

Tiempo (h)	Vol (mL)	Diámetro del halo de inhibición (mm) en la dil. 1:4 después de la adsorción ^a	Proteína (µg/mL)	
			antes	después
0	100	11	25.16	25.16
2	50	10	26.72	26.465
3	40	7.7	25.16	25.83
6	34	11	25.16	25.58
9	28	9.3	25.16	24.8
24	22	10	25.16	25.37

Los valores son el resultado del promedio de 2 determinaciones, donde cada determinación difirió en menos del 10% del promedio

a = El diámetro del halo incluye el diámetro del pozo (5mm)

Tabla 7. Curso temporal de la liberación de la bacteriocina WB1 a pH 2 sin previa adsorción

Tiempo (h)	Volumen (mL)	Dilución	Diámetro del halo (mm)	Proteína (µg/mL)
3	40	¼	0.7	0.843
6	34	¼	1.1	1.743
9	28	¼	0.9	1.5
24	22	¼	1.0	0.393

Los valores son el promedio de 2 determinaciones, en donde cada determinación difirió en menos del 5% del promedio

Tabla 8. Cambios en la actividad de la bacteriocina WB1 durante el proceso de diálisis

Volumen fermentado (mL)	Volumen buffer de resuspensión (mL)	DIÁLISIS								
		Tiempo (h)	Antes				Después			
			pH	Actividad (UA/mL)	Proteína (µg/mL)	Actividad específica (UA/µg)	pH	Actividad (UA/mL)	Proteína (µg/mL)	Actividad específica (UA/µg)
1000	44	36	2	12800	7.6	1684	5.3	1600	1.99	804
1500	69	48	2	12800	7.7	1662	5.6	3200	3.4	941

Tabla 9. Efecto del tween 80 en la producción y purificación de la bacteriocina WB1

Fermentación	Vol. de fermentación (mL)	ADSORCIÓN			LIBERACIÓN		Proteína (µg/mL)	DIÁLISIS
		pH	Actividad (UA/mL)		Buffer Vol. (mL)	Actividad ^a (UA/mL)		
			Antes	Después				Actividad (UA/mL)
Sin Tween 80	a)1000	na	800	na	44	12800	7.6	1600
	b)1500	na	1600	na	69	12800	7.7	3200
Con Tween 80	a)1500	8.5	6400	6400	69	1600	<1	100
	b)1500	8.5	3200	3200	69	1600	<1	0

na - no se realizó adsorción

a = bacteriocina adherida a células

5.7 Determinación del peso molecular de la bacteriocina WB1

Se realizó la electroforesis SDS-PAGE por el método de Shägger (1987) utilizando geles de poliacrilamida de 16.5%, 18% con urea. Así mismo, se utilizó un gel del 12% de poliacrilamida de acuerdo a lo indicado en el Short protocols for protein purification (1989). Con estas electroforesis no se obtuvieron bandas ni en los marcadores ni en las muestras por lo que no se pudo determinar el peso molecular de la muestra.

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE siguiendo el método de Laemmli (1970) utilizando un gel de gradiente de 12-19%, en donde si se obtuvo separación de bandas tanto en marcadores como en la muestra (Figura 13). Se observaron 6 bandas cuyos pesos moleculares fueron calculados mediante una ecuación obtenida graficando el log PM de los estándares contra Rf (distancia que recorre la muestra entre la distancia del frente). Los pesos moleculares obtenidos fueron los siguientes:

Banda	1	2	3	4	5	6
Peso molecular (Da)	11, 778	8,9993	8,325	7,136	5,554	4,001

5.8 Identificación de bandas con actividad

Para identificar las bandas con actividad se hizo un zimograma utilizando como microorganismo indicador a *M. luteus*. Todas las bandas de la muestra presentaron actividad (Figura 14).

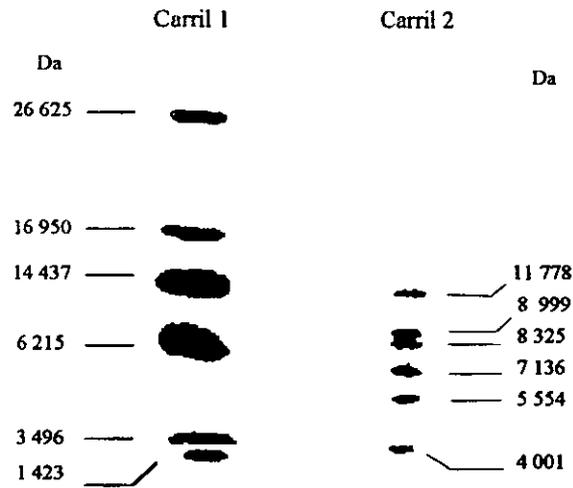


Figura 13. Gel 12-19% SDS-PAGE Tris Glicina teñido con azul de Coomassie. Carril 1, estándares de péptidos: Triosefostato isomerasa (26 625 Da); Mioglobina (16 950 Da); α -lactalbumina (14 437 Da); Aprotinina (6 512 Da); Cadena insulina b (3 496 Da) y Bacitracina (1 423 Da). Carril 2, bacteriocina WB1 formada por 6 bandas: banda 1 (11 778 Da); banda 2 (8 999 Da); banda 3 (8 325 Da); banda 4 (7 136 Da); banda 5 (5 554 Da), banda 6 (4 001 Da).

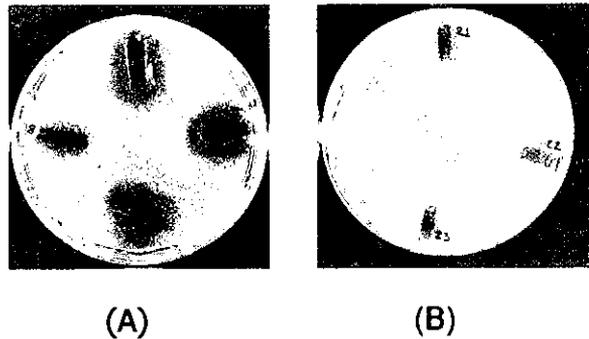


Figura 14. Fracciones del gel SDS-PAGE sometidas a incubación con *M. luteus* como microorganismo indicador. En la caja (A) se observan bandas con actividad. En la caja (B) se observan bandas sin actividad. Las 6 bandas obtenidas para la bacteriocina WB1 en la Figura 13 mostraron el comportamiento descrito en la caja (A).

VI. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 Selección del medio de cultivo para el crecimiento de *L. lactis*

El objetivo de esta parte inicial del trabajo fue obtener un medio de cultivo que proporcionará las siguientes características: un buen crecimiento de *L. lactis* ($DO > 1.0$), un pH final del extracto mayor a 6.5 (óptimo para determinación de actividad) y no interferencia del medio con la cuantificación de proteínas (Δ proteínas (+), y lecturas estables después de 5 minutos de reacción). Como se observa en la Tabla 5, ninguno de los medios estudiados reunió las 3 características juntas. De esta manera, se descartaron los medios cuya diferencia entre valores de proteína inicial y final (Δ) fue negativa (medios MRS, APT, CST-A y CST-B). De los medios restantes (CST Bioxon, CST oxoid, CST BBL y CST-C) se seleccionó aquél con el mayor diámetro de halo de inhibición y el menor error en la determinación de proteínas. Con base en lo anterior, el medio seleccionado para la preparación del inóculo y subsiguientes fermentaciones de *L. lactis* fue el medio CST-C.

6.2 Influencia de la temperatura y del pH en el crecimiento de *M. luteus*

ATCC 10420

Influencia de la temperatura

De acuerdo al estándar Británico BS4020:74, los tubos de agar assay a 50°C se adicionan con un 2% de una solución ajustada de *M. luteus* (DO_{650nm} de 0.5). Nuestros resultados (Figura 8) muestran que al adicionar a *M. luteus* en agar a 50°C, éste no crece en la sobrecapa a ninguna de las concentraciones probadas.

Por lo tanto, se probaron temperaturas de inoculación de 45 y 40°C encontrándose que la temperatura óptima para adicionar *M. luteus* en la concentración recomendada ($DO_{650nm} = 0.5$) al agar assay 0.8% es de 40°C.

Influencia del pH

Los resultados obtenidos al inocular a *M. luteus* en medio assay a diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5 y 7.5) nos muestran que este microorganismo indicador es muy sensible al pH del medio de crecimiento (Figura 9). De lo anterior se destaca la importancia de ajustar el pH, tanto del medio assay 0.8% como de los extractos libres de células que se colocan en las fosas, a valores entre 6.5 y 7.5; de lo contrario, los halos de inhibición estarían siendo afectados (aumentados) por efecto del pH. Cabe mencionar que en el caso de la nisina, en el método estándar británico BS4020:74, los extractos son ajustados a un valor de pH de 2.0 para efectos de disolución. En este caso, se corre un estándar interno para determinar el efecto del ácido *per se*.

6.3 Crecimiento y producción de bacteriocina WB1 por *L. lactis* en medio

CST-C

Existen reportes de que a lo largo de una fermentación, hay un tiempo en el cual se tiene una producción máxima de bacteriocina con una subsecuente disminución, observándose en las gráficas un pico de actividad estrechamente relacionado con las condiciones de pH (Joerger y Klaenhammer, 1986; Aktypis y col., 1998; Ibarra, 1999). Como se observa en la Figura 10, la producción de la bacteriocina WB1 presenta este pico de actividad algunas veces a las 8 h de

fermentación y otras veces a las 11 h. Esto es debido a que la fermentación se lleva a cabo en condiciones no controladas de pH. Para descartar estas variaciones se recomienda hacer fermentaciones a valores de pH constantes durante el crecimiento de *L. lactis*.

Así mismo, se observó que a la hora 8 de fermentación hay una gran divergencia en los triplicados obtenidos en cuanto a la producción de la bacteriocina WB1; en la primera fermentación se observó una actividad de 6400 UA/mL y en dos fermentaciones subsecuentes la actividad observada fue de 400 y 800 UA/mL. Esta variación puede ser atribuida a que, para la producción de la bacteriocina entre la primera y las subsecuentes fermentaciones, se resembró el cultivo de trabajo. Esto es, la primera fermentación se realizó con un cultivo proveniente de una chaquira y las 2 subsecuentes se realizaron con un cultivo proveniente de otra chaquira. De lo anterior se concluye que la cepa va perdiendo actividad conforme se congela y descongela durante las resiembras, por lo que es de vital importancia implementar un método de almacenamiento/resiembra de la cepa que garantice la estabilidad de la producción de la bacteriocina.

6.4 Adsorción a pH 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 y liberación a pH 2

Se observó que la adsorción de la bacteriocina WB1 a las células de *L. lactis* fue mayor a pH 6.5 y 7.5 que a pH 8.5 (Figura 11); sin embargo, la cantidad de bacteriocina liberada fue inversamente proporcional (Figura 12). Sin embargo, el seguimiento de la adsorción de la bacteriocina a través del tiempo a pH 8.5 demostró que la adsorción es prácticamente imperceptible en términos de proteína (Tabla 6). De lo anterior se concluye que los cambios de proteína en el medio

CST-C son menos perceptibles que los cambios en el diámetro de los halos de actividad.

6.5 Adsorción a pH 5.5 y liberación a pH 2

Se observó, que a pesar de no haberse presentado adsorción a pH 5.5 (Figura 11), si hubo liberación (Figura 12). De lo anterior se asume que no toda la bacteriocina producida por *L. lactis* es liberada al medio de cultivo, sino que, una parte esta disuelta en el medio de cultivo y otra parte se encuentra adherida a las células de *L. lactis*. Para confirmar lo anterior, se hizo un estudio (que se discute en el siguiente inciso) en el que las células de *L. lactis* fueron resuspendidas, inmediatamente después de la fermentación, en buffer, sin previa adsorción.

6.6 Liberación a pH 2 sin previa adsorción

Los resultados obtenidos al resuspender las células de *L. lactis* en buffer a pH sin previa adsorción (Figura 12) comprueban que, efectivamente, al término de la fermentación, una parte (60%) de la bacteriocina WB1 esta disuelta en el medio de cultivo CST-C y otra parte (40%) se encuentra adherida a las células de *L. lactis*. Interesantemente, se observó también que, las células que no fueron sometidas al proceso de adsorción, liberaron una mayor cantidad de bacteriocina que aquellas células sometidas a procesos de adsorción a diferentes valores de pH.

Al monitorear el proceso de liberación sin previa adsorción de la bacteriocina WB1 a través del tiempo, se encontró que son necesarias 6 horas de liberación para obtener los mayores halos de inhibición (i.e. actividad) coincidentes con la máxima cantidad de proteína (1.743 µg/mL) (Tabla 7). Estos resultados difieren

con los estudios reportados por Yang (1992) y Yildirim (1998) en experimentos de purificación por adsorción-liberación, donde la liberación se lleva a cabo por un lapso de 1 hora o bien toda la noche precedida de una fase de adsorción de 2 horas o de toda la noche.

Tomando en cuenta que el objetivo que se persigue a través del método de adsorción-liberación es obtener la mayor cantidad de bacteriocina posible resuspendida en un buffer libre de otras proteínas del medio, se concluye que la purificación de la bacteriocina WB1 puede llevarse a cabo mediante la resuspensión de las células de *L. lactis* inmediatamente después de la fermentación en buffer de NaCl 100 mM a pH 2, sin necesidad del proceso de adsorción. Por lo tanto, se decidió trabajar con las células de *L. lactis* sin previa adsorción de la bacteriocina, estableciéndose un lapso de liberación de 6 h en buffer de NaCl 100 mM pH 2 a 4°C.

6.7 Cambios de actividad de la bacteriocina WB1 durante el proceso de diálisis.

Una vez liberada la bacteriocina WB1 en el buffer a pH 2, se requiere de un proceso de diálisis para la eliminación de sales. La diálisis se realizó en volúmenes de 50 mL contra agua (pH 6.5) utilizando un volumen de 2 L; se realizaron de 6 a 8 cambios de agua. Este proceso tuvo una duración de 36 a 48 h (Tabla 8) con el afán de eliminar sales y equilibrar el pH a 6.5. Las sales se eliminaron, sin embargo el pH alcanzó valores únicamente de 5.3-5.6. Se considera que el tiempo utilizado es muy largo, ya que de 3 a 6 h deberían ser

suficientes en un procedimiento óptimo. Para lograr esto se recomienda dializar contra un buffer en vez de agua.

Por otro lado, se observó que la diálisis afecta la actividad de la bacteriocina produciendo pérdidas de aproximadamente 50%, tanto en actividad como en proteína (Tabla 8). Las causas a las que se les atribuye esta pérdida de bacteriocina pueden ser las siguientes:

- 1) El tiempo de diálisis es muy largo, de 36 a 48 h, tiempo en el que la bacteriocina WB1 esta expuesta a una temperatura de 4°C. En experimentos anteriores (no reportados) se ha observado que la actividad de la bacteriocina WB1 es afectada por la exposición a bajas temperaturas.
- 2) El punto de corte de la membrana es de 1000 y en general se recomienda que el poro de la membrana sea 10 veces más pequeño con respecto al peso molecular de la sustancia a separar (Millipore S. A de C. V). Sin embargo, para el caso de péptidos esto es casi imposible ya que estamos hablando de pesos moleculares del orden de 1000 a 12000 Da y la membrana más pequeña disponible en el mercado es de un punto de corte de 1000.
- 3) La bacteriocina se aglomera después de eliminar las sales, por lo que al filtrarlas (filtros de membrana de 0.2µm), algunas son retenidas en el filtro. Por lo tanto, es recomendable no filtrar después de la diálisis (Elegado y col.,1997).

Por todo lo anterior, para disminuir las pérdidas de actividad durante el proceso de diálisis se recomienda: a) Disminuir el tiempo de diálisis (Dializar contra un

buffer) y b) Usar un proceso de eliminación de sales diferente a la diálisis, por ejemplo: ultrafiltración.

6.8 Efecto del Tween 80 en el proceso de purificación

Algunos autores, como Elegado y col. (1997) utilizan un medio de cultivo adicionado con tween 80 para la producción de bacteriocinas. En el caso de la bacteriocina WB1, de acuerdo a los resultados obtenidos Tabla 9, se puede aseverar que el tween 80 beneficia la concentración de bacteriocina WB1 en el medio de cultivo, más no en el buffer de liberación y por ende, en la diálisis. Esto es, al final del proceso de purificación, la actividad de la bacteriocina WB1 producida en las fermentaciones con tween 80 es menor (100 y 0 UA/mL que en la fermentación donde no se utilizó tween 80 (1600 y 3200 UA/mL).

Se observó, así mismo que la determinación de proteínas por el método de Bradford se vio afectada por la presencia del tween 80, ya que se obtuvieron valores menores a 1µg/mL con valores de actividad de 1600 UA/mL, resultados que no se observan en las fermentaciones sin tween (Tabla 9). Se estimó el contenido de proteínas en estas muestras por el método del ácido bicinconínico (resultados no incluidos) observándose que el contenido de proteína fue mayor en la muestra sin tween 80 que en muestras con tween. De lo anterior se concluye que la adición de tween 80 es recomendable para purificar a la bacteriocina WB1 a partir del medio de cultivo, pero para purificar la bacteriocina a partir de las moléculas adsorbidas a *L. lactis*, no se recomienda el uso de este compuesto.

6.9 Determinación del peso molecular de la bacteriocina WB1

El peso molecular de la bacteriocina WB1 no se pudo determinar por medio de la SDS-PAGE sugerida por Shägger (1987), la cual se recomienda para péptidos y es utilizada en la mayoría de los artículos de purificación de bacteriocinas (Aktypis y col., 1998; Van Reenen y col., 1998). Aunque se intentó varias veces este método, no se pudieron obtener bandas separadas.

De acuerdo a los resultados anteriores se decidió utilizar la electroforesis SDS-PAGE siguiendo el método de Laemmli (1970). Dicha electroforesis es empleada para la identificación de peso molecular de proteínas principalmente (Janson y Rydén, 1989), pero fue adaptada para separar a los péptidos utilizando un gel de gradiente (12-19%) de poliacrilamida.

Con la utilización de dicho sistema se encontró que la muestra de bacteriocina WB1 tiene 6 bandas (Figura 13); cabe mencionar que la electroforesis se realizó por 3 veces consecutivas obteniendo siempre 6 bandas. Los pesos moleculares de las 6 bandas obtenidas comparados con los pesos moleculares de otras bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* se muestran en la Tabla 10.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los zimogramas (Figura 14), todas las bandas presentaron actividad antimicrobiana. Se considera que este caso el método puede ser impreciso, ya que fraccionar el gel sin teñir y calcular la fracción de correspondencia en el gel teñido es usualmente un método utilizado para detectar de 1 a 3 bandas. Para obtener resultados más conclusivos se recomienda separar la muestra por filtración en gel.

Sin embargo, independientemente de la actividad de las bandas, cabe mencionar que hay reportes de sistemas de bacteriocinas en las que se presentan dos bandas, que por separado tienen una determinada actividad, pero juntas presentan un aumento sinérgico (Nissen-Meyer, 1992). Y cabe recordar que el grupo IIb de bacteriocinas está conformado por péptidos que requieren un péptido complementario para ejercer actividad antimicrobiana, aunque el péptido complementario no presente actividad por sí mismo (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996).

No existen reportes de bacteriocinas que presenten más de 6 bandas. Debido a la alta actividad y al amplio espectro de inhibición que presenta la bacteriocina WB1 en comparación con otras bacteriocinas reportadas en la literatura, se presume que se trata de un sistema de bacteriocinas. Existen reportes de conjugación genética para obtener un sistema de bacteriocinas producido por un solo microorganismo (Marrug, 1993) por lo que un sistema producido de manera natural sería de gran interés y utilidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método de adsorción-liberación es apropiado para la purificación de la bacteriocina WB1. De esta manera se sientan las bases para futuros trabajos de caracterización de esta bacteriocina.

Tabla 10. Comparación de pesos moleculares de bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

Bacteriocina WB1	Peso molecular (Da)	Otras bacteriocinas producidas por <i>L. lactis</i>	
		Bacteriocina	Referencia
-	2,900	Lactacina 481	Piard y col. (1992)
-	3,500	Nisina A	Jarvis y col. (1968)
-	3,500	Nisina Z	Kaletta y Entian (1989)
Banda 6	4,001	-	-
Banda 5	5,554	-	-
Banda 4	7,136	-	-
Banda 3	8,325	-	-
Banda 2	8,999	-	-
Banda 1	11,778	-	-
-	20,000	Lactostrepcina 1, 2, 3, 4	De Vuyst y Vandamme (1994)
-	2,3000	Lactococina DR	Dufour y col. (1991)

VII. CONCLUSIONES

- La bacteriocina WB1 se encuentra en parte (60%) disuelta en medio de cultivo y en parte adsorbida (40%) a las células de *L. lactis* al final de la fermentación.
- La purificación de la bacteriocina adsorbida a las células de *L. lactis* puede llevarse a cabo mediante la liberación en buffer a pH 2 directamente después de la fermentación sin un procedimiento previo de adsorción.
- La bacteriocina WB1 esta conformada por 6 péptidos que presentan un rango de peso molecular entre 11778 y 4001 Da.
- Los 6 péptidos presentaron actividad antimicrobiana contra *M. luteus*.
- La diálisis afecta la actividad de la bacteriocina con pérdidas de hasta un 50%.
- El empleo de tween 80 en el medio de fermentación no es recomendable para purificar la parte de bacteriocina WB1 adsorbida a las células de *L. lactis* durante la misma. Sin embargo, se puede emplear si se desea purificar la bacteriocina a partir del medio de cultivo.
- Para obtener halos de inhibición conclusivos en la determinación de actividad, *M. luteus* debe ser adicionado al medio de cultivo a una temperatura de 40°C; y el pH, tanto del medio de cultivo como del extracto, debe ser ajustado a valores de 6.5-7.5.
- Los medios de cultivos MRS, APT, CST-A y CST-B interfieren en la determinación de proteínas por el método de Bradford. El medio CST-C permite llevar a cabo, y monitorear, la purificación de la bacteriocina WB1 de manera eficiente.

- Los resultados obtenidos en este trabajo presentan a la bacteriocina WB1 como un sistema natural de bacteriocinas . Hasta el momento, en la literatura no se ha reportado ningún sistema igual. Por lo anterior, éste estudio representa una base importante para continuar con las investigaciones de la bacteriocina WB1, la cual tiene un gran potencial para ser utilizada como conservador natural en alimentos.

VIII. RECOMENDACIONES PARA ESTUDIOS POSTERIORES

- Escalar la producción de la bacteriocina WB1 a fermentadores de 5-7 L para contar con una concentración suficiente para poder continuar con los estudios de purificación por filtración en gel.
- Purificar la bacteriocina que se encuentra en el extracto por métodos tradicionales, para obtener un comparativo del porcentaje de recuperación de ésta bacteriocina contra la bacteriocina adherida a la célula.
- Utilizar las células libres de bacteriocinas obtenidas después de la liberación para reabsorber la bacteriocina del medio de cultivo.
- Buscar un método alternativo a la diálisis para desalar la bacteriocina liberada en buffer, de manera que se obtengan mejores rendimientos y se economice en tiempo.

APÉNDICE 1

Determinación de biomasa de acuerdo al método de Rodés (1997)

1. Colocar un filtro de membrana (0.45 μm) en una caja Petri de vidrio y calentar a 90°C durante 12 h para llevarla a peso constante. Sacar de la estufa y colocar en un desecador para equilibrar la temperatura. Pesar la caja.
2. Tomar 20 mL (con una pipeta volumétrica) de cultivo en el principio de la fase estacionaria (La muestra utilizada se recolecta de la fermentación para la curva de crecimiento).
3. Colocar el filtro del desecador en una unidad millipore (utilizar pinzas). Agregar los 20 mL de cultivo y filtrar al vacío.
4. Con mucho cuidado, quitar el filtro de la unidad millipore y colocar nuevamente en la caja Petri. Secar a 90°C por 24 h.
5. Determinar la biomasa por diferencia de peso. Dividir el peso obtenido entre el número de mL de cultivo filtrado (20 mL) para obtener los mg biomasa/mL de medio.

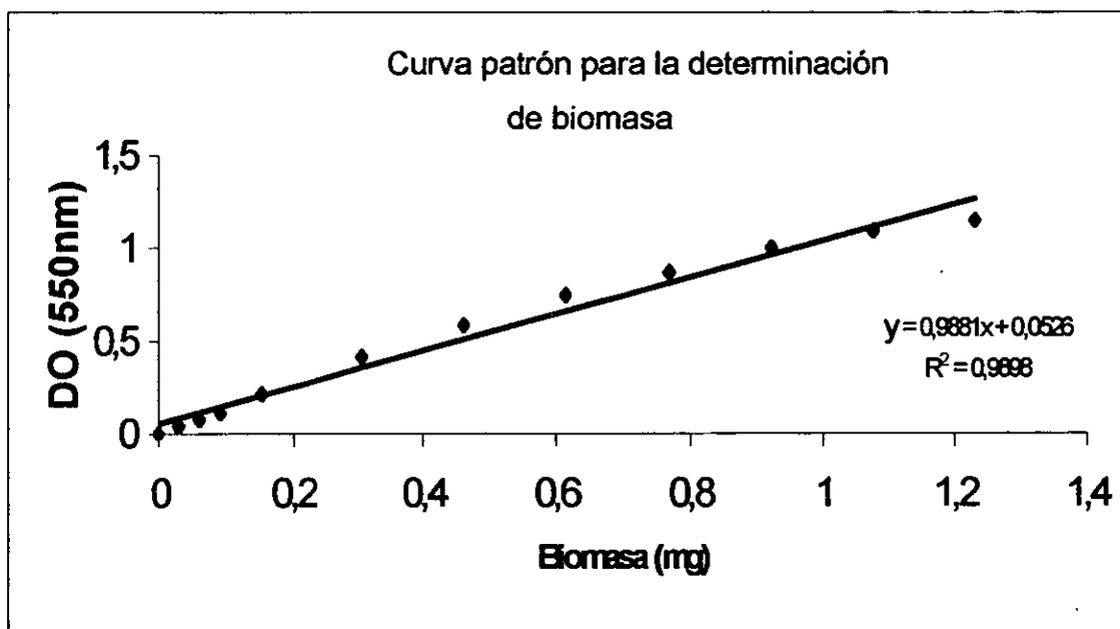
El valor de biomasa obtenido fue de: 0.615 mg/mL

6. Realizar las siguientes diluciones mezclando el cultivo con medio sin fermentar:

Dilución	Medio de cultivo inóculado(mL)	Medio sin inocular (mL)
0	2.00	0
1	1,75	0,25
2	1,50	0,50
3	1,25	0,75
4	1.00	1.00
5	0,75	1,25
6	0,50	1,50
7	0,25	1,75
8	0,15	1,85
9	0,10	1,90
10	0,05	1,95
11	0	2.00

7. Medir la densidad óptica de cada dilución a 550 nm. Calcular biomasa en mg para cada dilución. Trazar curva patrón para obtener una ecuación mediante la regresión de dicha curva.

Dilución	DO(550nm)	Biomasa (mg)
0	1,147	1,230
1	1,092	1,076
2	1,001	0,922
3	0,869	0,769
4	0,744	0,615
5	0,582	0,461
6	0,412	0,307
7	0,210	0,154
8	0,111	0,092
9	0,074	0,061
10	0,039	0,030
11	0	0

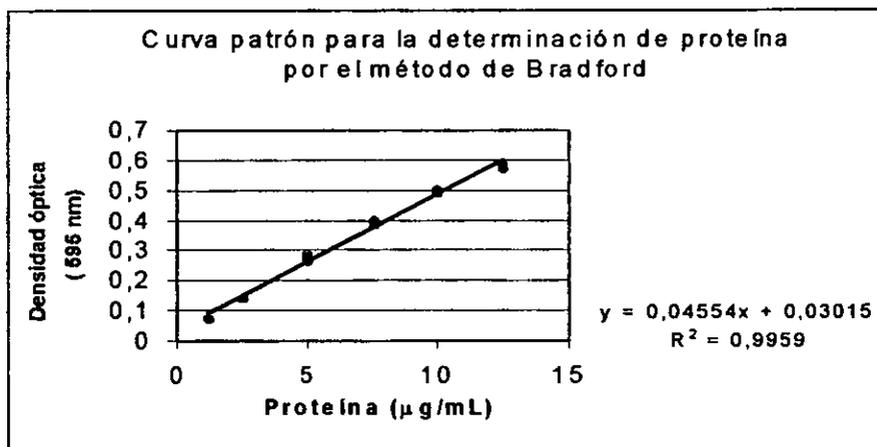


APENDICE 2

Preparación de la curva patrón para la determinación de proteína por el Método de Bradford

Se preparó una solución de albúmina bovina con una concentración de 20 µg/ml, de ésta solución se hicieron las siguientes diluciones por duplicado para la reacción y se leyó la densidad óptica a 595 nm obteniéndose los siguientes resultados:

Tubo	Albumina (µg/mL)	Reactivo Bradford (µL)	Agua (µL)	Sol. Albúmina (20 µg/mL)	Densidad óptica 1 (595 nm)	Densidad óptica 2 (595 nm)	Promedio de Densidad Óptica (595 nm)
1	1.25	200	750	50	0.072	0.068	0.070
2	2.5	200	700	100	0.142	0.137	0.140
3	5.0	200	600	200	0.263	0.281	0.272
4	7.5	200	500	300	0.405	0.381	0.393
5	10.0	200	400	400	0.503	0.489	0.496
6	12.5	200	300	500	0.571	0.580	0.5755
				m=	0.04558	0.4551	0.04554
				b=	0.316	0.02869	0.030158
				c.c.l	0.9938	0.9964	0.9959



IX. BIBLIOGRAFIA

1. Ahn, C. & Stiles, M. E. (1990). **Antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged meats.** J. Appl. Bacteriol., 69: 302-10.
2. Aktypis, A., Kalantzopoulos, G., Huis in't Veld, J. H. J. & Brink, B. (1998). **Purification and characterization of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040.** J. Appl. Microbiol. 84: 568-76
3. Andersson, R. (1988). **Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of Gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*.** Int. J. Food Microbiol., 3: 149-60.
4. Axelsson, L. & Holk, A. (1995). **The genes involved in production of and immunity to Sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706.** J. Bacteriol., 177 (8): 2125-37.
5. Aymerich, T., Holo, H., Havarstein, L. S., Hugas, M., Carriga, M. & Nes, I. F. (1996). **Biochemical and genetic characterization of Enterocin A from *Enterococcus faecium*, a New Antilisterial Bacteriocin in the Pediocin Family of Bacteriocins.** Appl. Environ. Microbiol. 62(5):1676-82
6. Barefoot, S. F., & Klaenhammer, T. R. (1983). **Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*.** Appl. Environ. Microbiol., 45:1808-15
7. Bell, J. E. & Bell, E. T. (1988). **Proteins and enzymes.** Prentice-Hall, New Jersey: 499.
8. Berjeaud, J. M., Guyonnet, D., Fremaux, C., & Genatiempo, Y. (1999). **A "Universal" method of Class IIa bacteriocin purification.** FEMS. Sixth symposium on Lactic Acid Bacteria. Genetics, Metabolism and applications. Veldhoven, the Netherlands c19
9. Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. & Kalchayand, N. (1991). **Mode of action of pediocin AcH from *Pediococcus acidilacti* H on sensitive bacterial strain.** J. Appl. Bacteriol., 70:25-33
10. Bhunia, A. K., Johnson, M. C. & Ray, B. (1987). **Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.** J. Ind. Microbiol., 2: 319-22.
11. British Standards Institutions (1974). BS:4020. **Methods for the estimations and differentiation of nisin in processed cheese.**
12. Cañas, A. O., Barzana, E., Owens, J. D. & Wachter, M. C. (1993). **La elaboración del pozol en Los Altos de Chiapas.** Ciencia, 44: 219-29
13. Cilano, L., Bossi, M. G. & Carini, S. (1990). **Produzione di batteriocine da parte di *Streptococcus thermophilus*.** Microbiol. Alim. Nutr. 8: 21-30.
14. Contreras, B.G.L., De Vuyst, L., Devreese, B., Busanyova, K., Raymaeckers, J., Bosman, F., Sablon, E. & Vandamme, E. J. (1997). **Isolation, purification, and amino acid sequence of Lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMG P-13139.** Appl. Environ. Microbiol. 63 (1): 13-20
15. Daba, H., Pandian, S., Grosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. & Lacroix, C. (1991). **Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*.** Appl. Environ. Microbiol., 57: 3450-5.

16. Daeschel, M. A. & Klanharnmer, T. R. (1985). **Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity.** Appl. Environ. Microbiol., 50: 1538-41.
17. Daeschel, M. A., McKenney, M. C. & McDonald, L. C. (1990). **Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11.** Food Microbiol, 7: 91-8
18. Davies, E. A., Milne, C. F., Bevis, H. E., Potter, R. W., Harris, J. M., Williams, G. C, Thomas, L. V. & Delves-Broughton, J. (1999). **Effective use of Nisin to control lactic acid bacterial soilage in vacuum-packed bologna-type sausage.** J. Food Protec., 62 (814): 40-46
19. De Klerk, H. C. & Coetzee, J. N. (1961). **Antibiosis among *Lactobacilli*.** Nature, 192:340-1
20. De Vuyst, L. & Vandemme, E. J (1994). **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** Blackie Academic & Professional, New York : 527
21. Delves-Broughton, E. (1998). **Nisin.** Bulletin of the DF329. Cap. 2: 9-13
22. Delves-Broughton, J. (1990). **Nisin and its uses as a food preservative.** Food Technol., 44: 100-112.
23. Deutscher, M. P. (1990). **Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification.** Vol.182. Academic press. New York.
24. Doyle, M. P., Michael, P., Beuchat, L. R. & Montville T. J. (1997). **Food microbiology. Fundamentals and frontiers.** American society for Microbiology: 353
25. Dufour, A., Thuault, D., Boulliou, A., Bourgeois, C. M. & Le Pennec, J. P. (1991). **Plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in a *Lactococcus lactis* strain and purification of the inhibitory peptide.** J. Gen. Microbiol., 137: 2423-9
26. Dykes, G. A. (1995) en Humbert, E., Lobos, O., Brevis, P. & Padilla, C. (1998). **Note: Purification and characterization of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp.** J. Appl. Microbiol., 84: 910-13.
27. Elegado, F. B., Kim, W. J., Kwon, D. Y. (1997). **Rapid purification, partial characterization, and antimicrobial spectrum of the bacteriocin, Pediocin AcM, from *Pediococcus acidilactici* M.** Int. J. Food Microbiol., 37 (1): 1-11
28. Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M. & Debevere, J. (1996). **Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: Characterization, production and bacteriocidal mode of action.** Int. J. Food Microbiol., 30: 189-215.
29. Etchells, J. L. Costilow, R. N., Anderson, T. E. & Bell, T. A. (1964). **Pure culture fermentation of brined cucumbers.** Appl. Microbiol., 12, 523-35.
30. Geis, A., Singh, J. & Teuber, M. (1983). **Potential of *Lactic streptococci* to produce bacteriocin.** Appl. Environ. Microbiol., 45: 205-11
31. Germond, J. E., Marciset, O., Mollet, B. (1997). **Bacteriocins from *Streptococcus thermophilus*.** United States Patent No. 5,683,890
32. González, C. F. & Kunka, B. S. (1987). **Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*.** Appl. Environ. Microbiol., 53: 2534-8.

33. Goulhen F., Meghrous, J. & Lacroix, C. (1998). **Characterization of nisin-resistant variants of *Pediococcus acidilactici* UL5, a producer of pediocin.** J. Appl. Microbiol. 85: 387-97
34. Gross, e., & Mollel, J. L. (1971). **The structure of nisin.** J. Am. Soc., 93: 4634-5
35. Hamdan, I. Y. & Mikolajcik, E. M. (1973). **Growth, viability, and antimicrobial activity of *Lactobacillus acidophilus*.** J. Dairy Sci., 56: 683.
36. Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C. & Stiles, M. E. (1991). **Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*.** J. Bacteriol., 173: 7491-500.
37. Héchard, Y., Derijard, B., Letellier, F. & Cenatiempo, Y. (1992). **Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*.** J. Gen. Microbiol., 138: 2725-31.
38. Herrera, T. & Ulloa, M. (1975). **Antagonismo del pozol y de *Agrobacterium azotophilum* sobre diversas especies de bacterias y hongos, algunas patógenas del hombre.** Rev. Latinoamer. Microbiol., 17: 143-47
39. Holo, H., Nilssen, O. & Nes, I. F. (1991). **Lactococcin A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris*: isolation and characterization of the protein and gene.** J. Bacteriol., 193: 3879-87
40. Humbert, E., Lobos, O., Brevis, P., Padilla, C. (1998). **Note: Purification and characterization of the bacteriocin PsVP-10 produced by *Pseudomonas* sp.** J. Appl. Microbiol. 84: 910-13.
41. Janson, J. C. & Rydén, L. (1989). **Protein purification. Principles, high resolution methods, and applications.** VCH Publishers, New York: 403
42. Jenson, I., Baid, L. & Delves- Broughton, J. (1994). **The use of Nissin as a Preservative in Crumpets.** J. Food Protect., 57 (10): 874-77
43. Jiménez- Díaz, R., Ríos-Sánchez, Desmazeaud, R. M., Ruiz-Barba, J. L. & Piard, J.-C. (1993). **Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation.** Appl. Environ. Microbiol., 59: 1416-24
44. Jiménez-Díaz, R., Ruiz-Barga, J. L., Cathcart, D. P., Holo, H., Nes, I. F., Sletten, K. H. & Warner, P. J. (1995). **Purification and partial amino acid sequence of Plantaricin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10, the activity of which depended on the complementary action of two peptides.** Appl. Environ. Microbiol. 61(12): 4459-63
45. Joerger, M. C. & Klaenhammer, T. R. (1986). **Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 481.** J. Bacteriol. 167(2):439-46
46. Kaiser, A.L. & Monville, T.J. (1996). **Purification of the bacteriocin Bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* scott A cells and lipid vesicles.** Appl. Environ. Microbiol., 62 (12): 4529-35.
47. Kalchayanand, N., Sikes, T., Dunne, C. D. & Ray, B. (1994). **Hydrostatic pressure and electroporation have increased bacterial efficiency in combination with bacteriocins.** Appl. Environ. Microbiol., 60: 4174-77.

48. Kanatani, K., Oshimura, M. & Sano, K. (1995). Isolation and characterization of Acidocin A and cloning of the bacteriocin gene from *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(3): 1061-67
49. Kanatani, K., Tahara, T., Yoshida, K., Miura, H., Sakamoto, M. & Oshimura, M. (1992). Plasmid-associated bacteriocin production by and immunity of *Latobacillus acidophilus* TK8912. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 56: 648-51
50. Kavanisckov, F. J. & Sudenco, I. (1967). Antibiotic properties of *Lactobacillus brevis*. *Mikrobiol. Sh. Kyyiv.*, 29:146
51. Kelly, U. J., Asmundson, R. V., & Huang, C. M. (1996). Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Bacteriol.*, 81: 657-62
52. Klaenhammer T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: 39-86
53. Kodama, R. (1952). Studies on lactic acid bacteria. 2. Lactolin-a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. *J. Antibiot.* 5: 72-4.
54. Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. & Topisirovic, L. (1991). Bacteriocin-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *Diacetyfactis* S50. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 1835-37
55. Kozak, W., Bardowski, J. & Dobrzanski, T. W. (1978). Lactostrepcins-acid bacteriocins produced by *lactis streptococci*. *J. Dairy Res.*, 45: 247-57
56. Kozak, W., Bardowski, J. & Dobrzanski, T. W. (1977). Lactostrepcin-A bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. *Bulletin de la Academe Polonaise des Sciences (Série des Sciences Biologiques Cl. Vi)*, 25: 217-21
57. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-85
58. Larsen, A. G., Vogensen, F. K. & Josephsen, J. (1993). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour dough: purification and characterization of bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* M1401. *J. Appl. Bacteriol.*, 75:113-22.
59. Lewus, C. B., Kaiser, A. & Montville, T. J. (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 5: 1683-8
60. Lewus, C. B., Sun, S. & Montville, T. J. (1992). Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 5: 143-9
61. López-Lara, I., Galvez, A., Martínez-Bueno, M., Maqueda, M. & Valdivia, E. (1991). Purification, characterization, and biological effects of a second bacteriocin from *Enterococcus faecalis* ssp. *liquefaciens* S-48 and its mutant strain B-48-28. *Can. J. Microbiol.*, 37: 769-74.
62. Marciset, O. & Mollet, B. (1993). Characterization of thermophilin 13, a bacteriocin of *Streptococcus thermophilus* Sfi13. *FEMS Microbiol. Rev.*, 12: P129, G25.
63. Marrug, J. D. (1991). Bacteriocins, their role in developing natural products. *Food Biothechnol.*, 5: 305-12

64. Marrug, John D., Ledebøer, A drianus M., Peter A., Henderson, James T. (1993). **United States Patent No. 5,260,212**
65. Mathieu, F., Sudirman Suwandhi, I., Rekhif, N., Millièri, J. B. & Lefebvre, G. (1993). **Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *Mesenteroides* FR 52.** J. Appl. Bacteriol., 74: 372-9.
66. Mattick, A. T. R. & Hirsch, A. (1944). **A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci.** Nature, 154: 551.
67. Mattick, A. T. R. & Hirsch, A. (1947). **Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci.** Lancet, 2:5-7.
68. Mattick, A. T. R. & Hirsch, A. (1956). **United Stated Patent No. 2,744,827**
69. Meghrou, J., Lacroix, C., Bouksaïm, M., La Pointe, G. & Simard, R. E. (1997). **Note: Genetic and biochemical characterization of nisin Z produced by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* UL 719.** J. Appl. Microbiol. 83: 133-38.
70. Miteva, V., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Danova, S., Moncheva, P., Mitev, V., Dousset, X. & Boyaval, P. (1998). **Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus dellbruekii* strain 1043.** J. Appl. Microbiol., 85: 603-14.
71. Moll, G. N., Konings, W. N. & Driessen, A. J. M., (1999). **Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation.** Antonie van Leeuwenhock, 76: 185-98.
72. Montville, T. J. & Winkowski, K. (1997). **Biologically Based Preservation Systems and Probiotic Bacteria.** Food Microbiol. Fundamentals and frontiers. Cap. 30: 557-74.
73. Morgan, S. & Hill, C. (1992). **Lactocin D, a bacteriocin producen by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* biovar. *Diacetyllactis* DPC938.** J. Ge. Microbiol. Submitted for publication.
74. Mortvedt, C. I. & Nes, I. F. (1990). **Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain.** J. Gen. Microbiol., 136: 1601-7.
75. Mulders, J. W. M., Boerrigter, I.J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. & De Vos, W. M. (1991). **Identification and characterization of the lactibiotic nisin Z, a natural nisin variant.** Eur. J. Biochem., 201: 518-84
76. Muñoz, M. C. (1981). **Prácticas de instrumentación analítica. Parte III. Métodos de separación.** LIMUSA, México: 17.
77. Muriana, P. M. & Klaenhammer, T. R. (1987). **Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88.** Appl. Environ. Microbiol., 53: 553-60
78. Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V., & Holo, H. (1996). **Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria.** Kluwer Academic Publishers. Antonie van Leeuwenhock 70: 113-28
79. Nielsen, J. W. & Dickson, J. S. J. D. (1990). **Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocitogenes* associated with fresh meat.** Appl. Environ. Microbiol., 56: 2142-45

96. Rodes, P. M. & Sanbury, P. F. (1997). **Applied microbial physiology. A practical approach.** Ed. Oxford University press.:116-117
97. Rogers, L. A. (1928). **The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*.**J. Bacteriol., 16: 321-25
98. Schillinger, U. & Lücke, F. K. (1989). **Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat.** Appl. Environ. Microbiol., 55: 1901-6.
99. Schillinger, U., Stiles, M. E. & Holzapfel, W. H. (1993). **Bacteriocin production by *Carnobacterium piscicola* LV61.** J. Appl. Bacteriol., submitted for publication.
100. Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y. & Juven, B. J. (1993). **Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*.** J. Appl. Bacteriol., 74: 67-77.
101. Scopes, R. K. (1994). **Separation in solution. Protein Purification Principles and Practice.** 3ra. Ed. Springer Verlag, New York. Cap.8: 238-53
102. Shagger, H. & Von Jagow, J. (1987). **Tricine-Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1 to 100 Kda.** Anal. Biochem. 166: 368-69.
103. Sherwitz, K. M., Baldwin, K. A. & McKay, L. L. (1983). **Plasmid linkage of a bacteriocin-like substance in *Streptococcus lactis* subsp. *Diacetylactis* strain WM4: transferability to *Streptococcus lactis*.** Appl. Environ. Microbiol., 45:1506-12
104. Siragusa, G. R. & Nettles Cutter, C. (1993). **Brochocin-C, a new bacteriocin produced by *Brochothrix campestris*.** Appl. Environ. Microbiol., 59: 2326-28
105. Smaczny, T. & Krämer, J. (1984). **Säuerungsstörungen in der Joghurt-, Bioghurt- und Biogarde-Produktion, bedingt durch Bacteriocine und Bakteriophagen von *Streptococcus thermophilus*.** Deutsche Molkerei-Zeit., 15: 460-4.
106. Stevens, D. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A. & Klaenhammer, T. R. (1991). **Nissin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other Gram-negative bacteria.** Applied Environmental Microbiology, 57:3613-3615.
107. Stiles, M. A. (1996). **Biopreservation by lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhoek 70: 331-45
108. Stoffels, G., Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. & Nes, I. F. (1992). **Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium* sp.** Appl. Environ. Microbiol., 58: 1417-22.
109. Strasser de Saad, A. M. & Manca de Nadra, M. C. (1993). **Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine.** J. Appl. Bacteriol., 7: 406-10.
110. Suárez, A. M., Azcona, J. I., Rodríguez, J. M., Sanz, B. & Hernández, P. E. (1997). **One-Step Purification of Nissin A by Immunoaffinity Chromatography.** Appl. Environ. Microbiol., 63 (12): 4990-92
111. Ten Brink, B., Minekus, M., van der Vossen, J. M. B. M., Leer, J. R. & Huis In't Veld, J. H. J. (1994). **Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of production of acidocin b, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46.** J. Appl. Bacteriol., 77:140-148.

112. Thuault, D., Beliard, E., Le Guern, J. & Bourgeois, C.-M. (1991). Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* by bacteriocin-like substances produced by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, 74: 1145-50.
113. Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. & Hammes, W. P. (1992). Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *L. sake* LTH673. *System. Appl. Microbiol.*, 15: 460-8.
114. Toba, T., Samant, S. K., Yoshioka, E. & Itoh, T. (1991a). Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA 6. *Lett. Appl. Microbiol.*, 13: 281-6.
115. Toba, T., Yoshioka, E. & Itoh, T. (1991c). Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 106-8.
116. Toba, T., Yoshioka, E. & Itoh, T. (1991d). Potential of *Lactobacillus gasseri* isolated from infant faeces to produce bacteriocin. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 228-31.
117. Toba, T., Yoshioka, E. & Itoh, T. (1991b). Lacticin, a bacteriocin produced by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*. *Lett. Appl. Microbiol.*, 12: 43-5.
118. Upreti, G. C. & Hinsdill, R. D. (1973). Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 4: 487-94.
119. Vakil, J. R. & Shahani, K. M., (1965). Partial purification of antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus*. *Bacteriol. Proc.*: 9
120. Van Belkum, M. J., Hayema, B. J., Geis, A., Kok, J. & Benema, G. (1989). Cloning of two bacteriocin genes from lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 1187-91
121. Van Reenen, C. A., Dicks, L. M. T. & Chikindas, M. L. (1998). Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J. Appl. Microbiol.*, 84:1131-37.
122. Vandenburg, P. A. (1991). Pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici*. Annual Meeting, Society for Industrial Microbiol., Philadelphia, PA. Aug. 4-9 Abstract #S101
123. Vaughan, E. E., Daly, C. & Fitzgerald, G. F. (1992). Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J. Appl. Bacteriol.*, 73: 299-308.
124. Vicent, J. G., Veomett, R. C. & Riley, R. F. (1959). Antibacterial activity associated with *Lactobacillus acidophilus*. *J. Bacteriol.*, 178: 477-84
125. Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. & Coppola, S. (1993). Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.*, 74: 380-7.
126. Voet, D. & Voet, J. G. (1995). *Biochemistry*. 2a. Edition. John Wiley & Sons, inc. New York, Cap. 2: 71-105
127. West, C. A. & Warner, P. J. (1988). Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.*, 49: 163-5

ESTA TESIS HA DEBE
 SAIR DE LA BIBLIOTECA

128. Yang, R., Johnson, M. C. & Ray, B. (1992). **Novel Method To Extract Large Amounts of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria.** *Appl. Environ. Microbiol.*, 58 (10): 3355-59
129. Yildirim, Z. & Johnson, M. G. (1998). **Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *Cremoris* R isolated from radish.** *Lett. Appl. Microbiol.*, 26: 297-304.
130. Zheng, G. & Slavik, M. F. (1998). **Detection and demonstration of inhibitory activities bacteriocins by isoelectric focusing.** *J. Rap. Methods and Automation in Microbiol.*, 6: 219-24.