



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO DE SUSTANCIAS ANTIMICROBIANAS
(POSIBLES BACTERIOCINAS) PRODUCIDAS POR
BACTERIAS DESLIZANTES**

TESIS

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

PRESENTA

ANGEL ALFREDO NÚÑEZ VÁZQUEZ



CDMX

2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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 BONILLA ESPINOSA

VOCAL: Profesor: RAQUEL ORTEGA MUÑOZ

SECRETARIO: Profesor: GLORIA DIAZ RUIZ

1er. SUPLENTE: Profesor: ALEIDA MINA CETINA

2° SUPLENTE: Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR, LABORATORIO ANEXO 1-A, EDIFICIO A.
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Raquel Ortega Muñoz _____

SUPERVISOR TÉCNICO:

DR. JESÚS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE _____

SUSTENTANTE:

ÁNGEL ALFREDO NÚÑEZ VÁZQUEZ _____

Índice

1.- Resumen	1
2.- Introducción	3
2.1 Aditivos alimenticios	3
2.1.1 Conservantes alimenticios	4
2.1.1.1 Conservantes químicos	5
2.1.1.2 Conservantes naturales	5
2.2 Antimicrobianos	6
2.2.1 Aplicación de conservadores en alimentos	7
2.3 Alimentos con probióticos	8
2.4 Péptidos antimicrobianos	9
2.5 Bacteriocinas	11
2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas	12
2.5.2 Mecanismo de acción	14
2.5.3 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos	15
2.6 Vida de anaquel	17
2.7 Bacterias deslizantes	18
2.7.1 Importancia del metabolismo secundario	19
3.- Justificación	21
4.- Objetivos	22
4.1 Objetivo general	22
4.2 Objetivos específicos	22
5.- Hipótesis	23
6.- Metodología	24
6.1 Diagrama de Flujo	24
6.2 Preparación de muestras ambientales para la obtención de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas	25
6.2.1 Cepas aisladas antes de este trabajo.	26
6.3 Aislamiento y purificación de cepas de Mixobacteria	26
6.3.1 Características Macro y microscópicas de las cepas	27
6.4 Preparación de extractos crudos	27
6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana	28
6.6 Tratamiento de extractos crudos	29
6.7 Purificación semi-parcial de extractos crudos	29
6.8 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	30
6.9 Determinación de proteína en los sobrenadantes	31
6.10 Acción de la pepsina sobre los posibles péptidos presentes en los diferentes extractos crudos	32
6.11 Prueba de la inhibición de la microbiota presente en un alimento	34

Índice

6.12 Determinación de UFC por dilución y vertido en placa para verificar si existe alguna diferencia en la carga microbiana de la leche	36
7.- Resultados y Discusión	37
7.1 Aislamiento y purificación de cepas de Mixobacterias	37
7.2 Características macro y microscópicas de las cepas	39
7.3 Evaluación de la posible actividad antimicrobiana	41
7.4 Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los extractos crudos	43
7.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de sobrenadantes semi-purificados sobre cepas tipo y una cepa multiresistente a antibióticos	45
7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los extractos semi-purificados	49
7.7 Determinación de proteína en los extractos crudos	50
7.8 Acción de la pepsina sobre extractos crudos	51
7.9 Prueba de inhibición sobre la microbiota presente en un alimento	55
7.10 Determinación de UFC después de emplear los extractos crudos con actividad antimicrobiana	56
8.- Conclusiones	58
9.- Perspectivas	60
10.- Referencias	61
11.- Anexos	67

1. Resumen

A partir del comienzo de la “era de los antibióticos”, se ha despertado un gran interés en explorar las capacidades biosintéticas de las diversas especies vegetales, animales y microbianas para obtener y derivar de ellas sustancias naturales con propiedades terapéuticas o nutritivas. Dentro de estas sustancias se encuentran las bacteriocinas, las cuales son compuestos proteínicos biológicamente activos, bactericidas o bacteriostáticos, frente a microorganismos de la misma especie o estrechamente relacionados. Tienen diversos usos en farmacología y en la conservación de los alimentos con el fin de generar productos de mayor vida útil y a la vez ofrecer al consumidor alimentos con un menor procesamiento industrial.

Siguiendo con esta búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas se proponen a las *Myxobacterias* como un grupo bacteriano capaz de producir sustancias antimicrobianas (bacteriocinas) que son útiles como inhibidores de otras bacterias. Estas sustancias antimicrobianas producidas por *Mixobacterias* pueden ser utilizadas contra bacterias resistentes a antibióticos y de igual manera pueden utilizarse como un conservador natural de alimentos. El objetivo de este trabajo es caracterizar la actividad antimicrobiana de las posibles bacteriocinas producidas por bacterias deslizantes y comprobar su actividad antimicrobiana sobre bacterias tipo. Además, se realizaron ensayos para determinar si podrían servir como conservador de alimentos. Para ello se probaron dichos extractos proteicos sobre leche bronca determinando su posible efecto bacteriostático en bacterias presentes en dicho tipo de leche.

1. Resumen

Se logró el aislamiento de 16 cepas de mixobacterias de las cuales se obtuvieron los sobrenadantes libres de células de los medios de cultivo y se probó si estos podían inhibir a cepas tipo y cepas multirresistentes a antibióticos. De estos sobrenadantes se seleccionaron 6 por presentar un mejor efecto inhibitorio: 3 de los cultivos del género *Mixococcus*, 2 del género *Stigmatella* y 1 del género *Sorangineae*. Se realizaron geles desnaturalizantes SDS-PAGE para comprobar la presencia y conocer el tamaño de las proteínas presentes en los extractos.

Posteriormente, se realizó una semipurificación de los extractos, probando la inhibición de cada fracción obtenida. Se utilizó pepsina sobre los extractos proteicos para confirmar su naturaleza proteica determinándose que al ser sometidos a hidrólisis enzimática el efecto de inhibición sobre las bacterias tipo y resistentes no se presentó.

Finalmente, se hizo una prueba cualitativa de reducción del colorante azul de metileno en leche bronca. Para ello se utilizaron los extractos semi-purificados para determinar si pueden actuar como bacteriostáticos y retrasar el crecimiento de la flora bacteriana presente en leche bronca con lo cual se observó un retardo en la reducción del colorante después de 4 horas demostrando con esto un efecto bacteriostático.

2. Introducción

2.1 Aditivos Alimenticios

Aunque los aditivos alimenticios se asocian a los tiempos modernos, estos llevan siglos utilizándose. Se emplean desde que el hombre aprendió a conservar los alimentos de la cosecha para el año siguiente y a conservar la carne y el pescado con técnicas de salazón y ahumado. Los egipcios utilizaban colorantes y aromas para realzar el atractivo de algunos alimentos, y los romanos empleaban salmuera (nitrato potásico), especias y colorantes para conservar y mejorar la apariencia de los alimentos (García-Jiménez, 2008).

Gracias al desarrollo de la ciencia y la tecnología de la alimentación en los últimos 50 años, se han descubierto varias sustancias nuevas que pueden cumplir funciones benéficas en los alimentos y estas sustancias, denominadas aditivos alimentarios, están hoy al alcance de todos (García-Jiménez, 2008).

Por definición, un aditivo alimenticio es cualquier sustancia que no se consume normalmente como alimento, ni tampoco se usa como ingrediente básico en alimentos, tenga o no valor nutritivo, y cuya adición al producto con fines tecnológicos en sus fases de producción, elaboración, preparación, tratamiento, envasado, empaquetado, transporte o almacenamiento, pueda preverse razonablemente que resulte (directa o indirectamente) por sí o sus subproductos, en un componente del producto o un elemento que afecte a sus características (incluidas las organolépticas) (Chertorivski, 2012).

La clasificación de los aditivos se realiza siguiendo el criterio de sus funciones tecnológicas más frecuentes y son (García-Jiménez *et al.*, 2008):

- 1) Modificadores de los caracteres organolépticos, pues influyen sobre el color, sabor y olor. Son el caso de:
 - a) Colorantes: naturales y artificiales
 - b) Potenciadores de sabor

2. Introducción

- c) Edulcorantes: naturales y artificiales
- d) Sustancias aromáticas
- 2) Estabilizadores de las características físicas:
 - a) Emulgentes
 - b) Espesantes
 - c) Antiaglomerantes
- 3) Inhibidores de alteraciones de tipo químico, como son:
 - a) Antioxidantes
 - b) Conservadores

2.1.1 Conservantes alimenticios

Cuando adquirimos un alimento, éste puede ser procesado (cárnicos, mermeladas, panes, etc.) o no procesado (fruta, vegetales, granos, etc.). Sea cual sea el origen, es posible que dicho alimento pueda haber sufrido alguna contaminación de manera no intencional o contener algún aditivo. Dentro de los contaminantes no intencionales se pueden encontrar componentes naturales del propio alimento, toxinas producidas por alguna bacteria, productos derivados del procesamiento del alimento y de la contaminación ambiental, contaminantes que resultan de la manipulación del alimento tales como pesticidas y fertilizantes, entre otros. Los conservadores se adicionan con el propósito de controlar el crecimiento de microorganismos (bacterias y hongos), y pueden ser químicos o naturales (bioconservadores) (Barboza-Corona, *et.al.* 2004).

Un aspecto importante a considerar es que ningún aditivo conservador es eficaz sobre todo el espectro contaminante por lo que es bastante infrecuente la utilización de un solo método antimicrobiano para preservar un alimento y, siempre que es posible, se recurre a la combinación de varios procedimientos suaves encaminados a obtener una máxima inhibición de la actividad microbiana y un

2. Introducción

mínimo deterioro del valor nutritivo o de la aceptabilidad del producto (Villada, 2010).

Las condiciones de uso de los conservantes están reglamentadas estrictamente en todos los países del mundo. Usualmente existen límites a la cantidad que se puede añadir de un conservante y a la de conservantes totales. Los conservantes alimentarios, a las concentraciones autorizadas, no matan en general a los microorganismos, sino que solamente evitan su proliferación. Por lo tanto, solo son útiles con materias primas de buena calidad (Rodríguez-Sauceda, 2011).

2.1.1.1 Conservantes químicos

Los conservantes químicos son sustancias que se añaden a los productos alimenticios para protegerlos de alteraciones biológicas como fermentación enmohecimiento y putrefacción. Entre los conservadores químicos se encuentran el benzoato de sodio, el ácido sórbico, sulfitos, nitritos, nitratos, peróxido de hidrógeno y cloruro de sodio (Madrid *et al.*, 2001).

2.1.1.2 Conservantes naturales

Las tendencias actuales de los consumidores indican su preferencia por alimentos de fácil preparación, de calidad, seguros y naturales, que estén poco procesados pero a la vez tengan una mayor vida útil. Las tecnologías de conservación de alimentos tienen como reto, obtener productos más duraderos sacrificando al mínimo sus características nutricionales y sensoriales iniciales (Rodríguez-Sauceda, 2011).

A pesar de que la mayor parte de los conservadores usados en alimentos son de origen químico, existen diversos productos de origen natural provenientes de plantas y microorganismos que pueden ser usados como bioconservadores en alimentos. Se estima que del 1 % al 10 % de las cerca de 500 000 especies de plantas que existen en el mundo, tienen uso como alimento o medicinal. Existen

2. Introducción

diversos productos de origen botánico los cuales poseen una actividad antimicrobiana como el ajo, orégano, mostaza, canela, albahaca, tomillo, pimienta, mejorana, chile, achiote, cebolla, cilantro, té, limón y naranja (Barboza-Corona, *et.al.* 2004).

2.2 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias que se obtienen por síntesis o naturalmente a partir de los cultivos de microorganismos. Mediante modificaciones de la estructura química de un agente obtenido naturalmente, es posible producir agentes semisintéticos (Errecalde, 2004).

Desde la aparición del primer antimicrobiano (Salvarsan en 1910) hasta la fecha se han encontrado diversas clases de agentes antimicrobianos teniendo un arsenal biológico contra las bacterias patógenas que afectan a los humanos, a los animales, plantas, alimentos, etc. (Yamaguchi, 2001).

En la práctica se utiliza el término "antibiótico" para englobar a los antimicrobianos biológicos (sintetizados por un microorganismo vivo) y de síntesis. Ambos se caracterizan por poseer "toxicidad selectiva"; no afectan o son relativamente inocuos para las células del huésped, a diferencia de los desinfectantes y antisépticos, que afectan a ambos. La toxicidad selectiva se logra gracias a las diferencias existentes entre el huésped y el microorganismo invasor; el mejor ejemplo lo constituye la penicilina, que provoca la lisis bacteriana por inhibición de la síntesis de la pared celular, no existiendo una estructura comparable en las células de los mamíferos (Saenz, 2007).

2. Introducción

2.2.1 Aplicación de conservadores en alimentos

El uso de antimicrobianos (conservadores) es una práctica común en la industria de los alimentos. Por muchos años se han utilizado antimicrobianos sintetizados químicamente que en algunos casos han causado daño a la salud de los consumidores, redundando en un rechazo por parte de los consumidores de productos procesados, por lo cual ha surgido la necesidad de buscar otras opciones. En esta búsqueda se han encontrado nuevos agentes antimicrobianos de origen natural, como sustitutos de los tradicionalmente utilizados (Nychas, 1995).

Los consumidores consideran que muchos alimentos procesados presentan una calidad nutricional pobre y que los aditivos sintéticos son peligrosos para la salud. Como resultado de estas demandas, se tiene un gran interés en desarrollar alimentos con agentes antimicrobianos naturales, los cuales deben ser inocuos, que cumplan los parámetros de calidad y seguridad de las normativas aplicables para agentes antimicrobianos y que además presenten un alto espectro de efectividad contra microorganismos (Beristain- Bauza *et. al.*, 2012).

La mayor parte de los antimicrobianos alimentarios solamente son bacteriostáticos (sistemas de conservación que impiden el desarrollo de gérmenes) o fungistáticos, en lugar de bactericidas (sistemas de conservación que destruyen los gérmenes) o fungicidas, por lo que su efectividad sobre los alimentos es limitada. Por otra parte, debido a que algunos microorganismos pueden no verse inhibidos o destruidos por las dosis convencionales de antimicrobianos utilizados individualmente, puede ser preferible utilizar una combinación de ellos, ampliando así el espectro de cobertura en la preservación de frutas o alimentos en general (Blanchard, 2000).

2. Introducción

2.3 Alimentos con probióticos

Los alimentos probióticos son aquéllos a los cuales se les han adicionado microorganismos que benefician la salud del hospedero, manteniendo un equilibrio en la microbiota intestinal. En el mercado se puede encontrar una gran variedad de productos probióticos en diferentes presentaciones, que van desde yogurt, productos farmacéuticos, hasta fermentados lácteos agrdulces. Las bacterias que pueden servir como probióticos se pueden aislar de diferentes tipos de materiales: del tracto intestinal humano, carnes, frutas y vegetales fermentados (Barboza-Corona, *et.al.* 2004).

Como microorganismos probióticos se utilizan sobre todo, aunque no exclusivamente, bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y el número de alimentos probióticos puestos a disposición de los consumidores es cada vez mayor.(FAO, 2006)

La forma más frecuente de consumir probióticos es a través de alimentos lácteos que contienen especies intestinales de lactobacilos y bifidobacterias; por los efectos benéficos adicionales a los nutritivos. Una forma de actuar de los probióticos para lograr alcanzar un buen estado de salud del individuo, es a través de la resistencia otorgada contra la invasión de microorganismos patógenos, que se logra mediante la generación de sustancias antimicrobianas como ácido láctico y otros ácidos de cadena corta, metabolitos como peróxido de hidrógeno, diacetilo y bacteriocinas (González-Martínez, 2002).

Además de que las BAL proporcionan sabor y textura e incrementan el valor nutricional de los alimentos, desde hace décadas se utilizan en la industria alimenticia como bioconservadores debido a la producción de bacteriocinas y otras sustancias que ejercen acción antibacteriana que contribuyen a la prevención de la descomposición de los alimentos (Campos, 2002).

2. Introducción

Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL, algunas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos (Stiles, 1996).

2.4 Péptidos antimicrobianos

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que la resistencia antimicrobiana es una de las amenazas más importantes para la salud humana, la cual surge por mutación del microorganismo o adquisición de genes de resistencia. El uso inadecuado de los antibióticos crea condiciones favorables a la aparición, propagación y persistencia de microorganismos resistentes, esto evidencia la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones que permitan sustituir a los antibióticos convencionales. Si bien se han desarrollado nuevas tecnologías para el descubrimiento de fármacos, la naturaleza sigue siendo el punto de partida más importante para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos (Tonarelli *et al.*, 2013).

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son las moléculas efectoras del sistema inmune innato, cuyas familias se encuentran en casi todos los organismos, desde bacterias hasta mamíferos. Son una familia de sustancias polifacéticas con complejos mecanismos de acción relacionados con la interacción con el patógeno a través de su membrana o afectando blancos internos, como la replicación del ADN y la síntesis de proteínas, e interactuando con el huésped con funciones inmunomoduladoras del proceso inflamatorio y de la cicatrización (Téllez y Castaño, 2010).

Los péptidos antimicrobianos pueden clasificarse según su estructura secundaria y su composición, como lineales, de hélice alfa, caracterizados por el enriquecimiento de uno o dos aminoácidos, que contienen puentes disulfuro y

2. Introducción

fragmentos de otras proteínas más grandes con actividad antibacteriana. La mayoría de los péptidos antimicrobianos descritos hasta ahora son codificados por genes y se sintetizan en los ribosomas, aunque existen otros que son el resultado de metabolitos secundarios. El espectro de actividad de los péptidos antimicrobianos es amplio. Se encuentra actividad antiviral, antifúngica, antibacteriana e, incluso, en algunos casos, antitumoral (Téllez y Castaño, 2010).

La producción de PAM por bacterias se considera un mecanismo de defensa, ya que así combaten a otros microorganismos que compiten por nutrientes. Los PAM de origen microbiano generalmente se conocen como bacteriocinas y en su mayoría presentan muchas modificaciones postraduccionales entre las que se incluye circularización y aminoácidos inusuales como los D-aminoácidos y lantioninas (Montaño y Vargas, 2002).

Las bacterias Gram negativas producen dos tipos de PAM: a) bacteriocinas con masa de alrededor de 20kDa, como las colicinas producidas por *E. coli*, y b) microcinas, menores de 10kDa, producidas por *Enterobacteriaceae*. Estas últimas son altamente modificadas y presentan tres diferentes mecanismos de acción: inhibición de enzimas metabólicas, inhibición de la replicación del DNA e interferencia en los procesos energéticos. Las bacterias Gram positivas producen bacteriocinas menores de 6kDa, usualmente catiónicas, anfifílicas y permeables en membranas (Montaño y Vargas, 2002).

2. Introducción

2.5 Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos producidos por un gran número de bacterias, incluyendo las del grupo BAL. Normalmente actúan contra microorganismos no deseados, estrechamente relacionados o responsables del deterioro de alimentos y causantes de enfermedades. Por esta razón, se utilizan en varias aplicaciones, como la biopreservación, la extensión de la vida útil, la acción antimicrobiana clínica y para el control de fermentaciones (Marcos *et al.*, 2013).

El término “bacteriocina” fue propuesto por primera vez por Jacob y colaboradores en 1953 para referirse a las sustancias proteicas con actividad antimicrobiana de origen bacteriano; luego, en 1976, Tagg y colaboradores las definieron como un grupo de sustancias antimicrobianas de origen bacteriano, caracterizadas por poseer un componente proteico biológicamente activo y por ejercer un modo de acción bactericida (Cristóbal, 2008). No obstante, se tienen reportes que la primera bacteriocina fue identificada por Gratia en 1925, como una proteína antimicrobiana producida por *Escherichia coli* (Marcos *et al.*, 2013).

Las bacteriocinas comprenden un grupo grande y diverso de proteínas o péptidos antimicrobianos sintetizados ribosómicamente, algunos de los cuales presentan modificaciones post-traduccionales, que tienen un efecto bactericida o bacteriostático en otras bacterias, ya sean de la misma especie (espectro estrecho) o de otros géneros (espectro amplio) (Marcos *et al.*, 2013). La célula productora sintetiza una molécula que la inmuniza contra la propia bacteriocina. La producción ocurre de forma natural durante la fase logarítmica del desarrollo bacteriano o al final de la misma, guardando relación directa con la biomasa producida (Vázquez *et al.*, 2009).

2. Introducción

Las bacteriocinas están conformadas por puentes disulfuro, tioéster o grupos tiol libres y cuentan con puntos isoeléctricos en un intervalo de pH 8.6 a 10.4 (Cotter *et al.*, 2005)

La síntesis de las bacteriocinas se produce, generalmente, cuando las bacterias que las sintetizan se encuentran en situaciones de estrés. Como es habitual en las rutas metabólicas de los microorganismos, la síntesis de las bacteriocinas también depende del ecosistema, pH, potencial de óxido-reducción, cantidad de nutrientes, fase de crecimiento, temperatura y oxígeno disponible. Así mismo, son inactivadas por enzimas como la tripsina y la pepsina las cuales, al encontrarse en el tracto digestivo, no permiten que las bacteriocinas alteren la microbiota existente en él (Marcos *et al.*, 2013).

2.5.1 Clasificación de las bacteriocinas

Las bacteriocinas se clasifican de acuerdo a sus características bioquímicas y genéticas:

Clase I: Lantibióticos.- Son péptidos pequeños activos a nivel de membrana y que contienen algunos aminoácidos poco comunes como lantionina, b-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción. Con poca estabilidad al calor, son péptidos poli cíclicos (< 5 kDa) con aminoácidos modificados. A su vez, en función de su estructura y modo de acción, los lantibióticos se subdividen en 2 grupos (Monroy *et al.*, 2009):

Clase I a: De masa molecular variable entre 2-4 kDa y una carga neta positiva. Ejemplos de este grupo son la lacticina 3147 y la nisina (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase I b: Péptidos con características globulares, hidrófobos que interfieren inhibiendo reacciones enzimáticas esenciales en bacterias sensibles. Su masa molecular varía de 2-3 kDa, pueden tener carga negativa (Mondragón *et al.*, 2013).

2. Introducción

Clase II: No lantibióticos.- Son péptidos pequeños (< 10 KDa) y termoestables, que actúan a nivel de la membrana plasmática. En este grupo se pueden identificar tres subclases (Monroy *et al.*, 2009):

Clase II a: Son péptidos activos contra *Listeria*, ejemplos de éstas son pediocina PA-1 y sakacina P (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase II b: Formadores de complejos, requieren de dos péptidos para una mejor actividad antimicrobiana y dar paso a la formación de poros; miembros de este grupo son lactococcina G, plantaricinas EF y JK, Lactacin F (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase II c: Pequeños péptidos, termoestables, no modificados y que son transportados por péptidos líder. Ejemplos de éstas son divergicina A y acidocina B (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase III: Reúne grandes péptidos (>30kDa) termolábiles, con actividad y estructura compleja (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase IV: Bacteriocinas complejas: son péptidos con una parte proteica y una o más fracciones de lipídicas o glucídicas necesarias para su actividad biológica (Mondragón *et al.*, 2013).

Clase V: Bacteriocinas de estructura circular y no modificadas postraduccionalmente. A esta clase pertenecen la enterocina AS-48 y la gasericina A (Monroy *et al.*, 2009).

2. Introducción

2.5.2 Mecanismo de acción

La mayoría de las bacteriocinas actúan sobre la membrana de células sensibles, desestabilizándola y permeabilizándola mediante la formación de conductos o poros iónicos (Grande *et al.*, 2005).

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

La mayoría de las investigaciones han demostrado que la actividad bactericida de las bacteriocinas, se dirige principalmente contra bacterias Gram-positivas. Sin embargo, existen numerosas bacteriocinas que presentan un amplio rango de acción inhibiendo especies Gram-negativas, hongos patógenos y virus. (Beristain-Bauza, 2012).

2. Introducción

2.5.3 Aplicación de las bacteriocinas en alimentos

Las bacteriocinas son una opción atractiva que podría ofrecer una solución a los retos que enfrenta la industria alimentaria en la actualidad, ya que busca satisfacer la demanda de alimentos libres de microorganismos patógenos, alimentos con una larga vida de anaquel y alimentos que no contengan conservadores químicos, ya que estas moléculas inhiben a numerosos microorganismos patógenos alimentarios. Son estables al calor y son activas en intervalos amplios de pH. Esto también es gracias a que son productos bacterianos naturales que se inactivan fácilmente por proteasas intestinales, por lo que la gran mayoría cumplen con las características que requiere un producto para utilizarse como bioconservador (López *et al*, 2008).

Actualmente, se ha demostrado que presentan alto potencial en la biopreservación de carne, productos lácteos, alimentos enlatados, pescado, bebidas alcohólicas, ensaladas, huevo, productos de panificación, vegetales fermentados, entre otros, ya sea solos o en combinación con otros métodos (Beristain-Bauza, 2012).

Comúnmente se usan tres métodos de aplicación de la bacteriocina (Mondragón *et al.*, 2013).

1. La inoculación directa de BAL en el alimento para producir bacteriocinas en el producto.
2. Aplicación de la bacteriocina purificada o semipurificada como preservador en el alimento.
3. Uso de un producto previamente fermentado con la producción de la bacteriocina como un ingrediente en un alimento procesado.

2. Introducción

Algunas de las aplicaciones más importantes de las bacteriocinas en alimentos son:

- a) En productos enlatados se aplican para controlar el crecimiento de termófilos esporulados. La adición de la nisina además de inhibir a dichos microorganismos prolonga el almacenamiento de estos productos a temperatura ambiente (Delves-Broughton, 2005)
- b) En productos cárnicos se utilizan para inhibir a *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *S. Typhimurium* y *E. coli*. También se busca reducir el uso de nitritos y sus derivados (Beristain- Bauza, 2012).
- c) En los vinos previenen el crecimiento de las BAL y aseguran la ausencia de la fermentación maloláctica. En la cerveza inhibe el crecimiento de lactobacilos y pediococos que conducen a una cerveza con exceso de acidez y sabores extraños (Naidu et al., 2006).
- d) En quesos controlan el crecimiento de las BAL y así evitan sabores extraños en los productos y además promueve la aceleración de la maduración (Beshkova y Frengova, 2012). En la leche, previenen la esporulación de bacterias termofílicas resistentes al calor que pueden sobrevivir a la pasteurización (Ekbal et al.,2012)

Dentro de las bacteriocinas más utilizadas en la industria alimentaria se encuentran la nisina y la pediocina, siendo la nisina la primer bacteriocina aislada en 1928 y que ayuda a inhibir a bacterias Gram positivas, *Listeria*, *Staphylococcus* y *Mycobacterium*, y las bacterias formadoras de esporas *Bacillus* y *Clostridium*. En el caso de la pediocina se utiliza para la inhibición de bacterias Gram positivas entre las que se encuentran las responsables de algunas tox infecciones alimentarias como *Bacillus*, *Brochotrix*, *Listeria* y *Staphylococcus* (Agudelo et al., 2015).

2. Introducción

2.6 Vida de Anaquel

La vida útil de un alimento se define como el tiempo finito después de su producción en condiciones controladas de almacenamiento, en las que tendrá una pérdida de sus propiedades sensoriales y fisicoquímicas, y sufrirá un cambio en su perfil microbiológico. Una forma en que los consumidores pueden conocer la vida útil del alimento que están adquiriendo, es buscando en la etiqueta del producto la fecha de caducidad o la fecha de consumo preferente; ambas indican el fin de la vida útil del alimento. Fecha de caducidad: es la fecha a partir de la cual un producto no se debe ingerir, con el fin de evitar problemas sanitarios. Fecha de consumo preferente: es la fecha que indica que el contenido ya no ofrece toda su calidad al consumidor (Carrillo *et al.*, 2013)

Puede variar según el proceso de producción, la naturaleza del producto y el tiempo de almacenamiento, obteniéndose cambios a nivel microbiológico, sensorial y/o físico-químicos. Es importante identificar los factores específicos que afectan la vida útil y evaluar sus efectos individualmente y en combinación. Estos se pueden dividir en: a) factores intrínsecos: materia prima (composición, estructura, naturaleza), actividad de agua, pH, acidez, disponibilidad de oxígeno y potencial Redox (Eh); y b) factores extrínsecos: procesamiento, higiene y manipulación, materiales y sistemas de empaque, almacenamiento, distribución y lugares de venta (Valencia *et al.*, 2008).

2. Introducción

2.7 Bacterias deslizantes

Las mixobacterias son bacterias Gram-negativas, bacilos largos y finos con una longitud de 3-12 μm y un diámetro de 0,7-1,2 μm . Las mixobacterias muestran varias características sorprendentes que las hacen muy diferentes del resto de la subdivisión de las Proteobacterias (Jiménez-López *et al.*, 2007).

El verdadero hábitat de las mixobacterias es el suelo, siempre y cuando el pH sea ligeramente ácido a ligeramente alcalino, es decir, entre 5 y 8. Ocasionalmente también se han encontrado en la superficie de las hojas de la planta. En los suelos según su frecuencia de ocurrencia, las especies siguientes son más típicas: *Nannocystis exedens*, *Corallocooccus coralloides*, *Sorangium cellulosum*, diferentes especies de *Polyangium*, *Myxococcus fulvus*, diferentes especies de *Cystobacter* y *Myxococcus stipitatus* (Dawid, 2000).

Las mixobacterias viven formando grandes comunidades conocidas como enjambre y se alimentan degradando una gran variedad de macromoléculas tales como proteínas, almidón, lípidos, ácidos nucleicos e incluso celulosa porque producen una extraordinaria batería de sustancias hidrolíticas extracelulares. De hecho, pueden utilizar no sólo macromoléculas, sino también células enteras como *E. coli*, levaduras u otras especies diferentes de mixobacteria (Jiménez-López *et al.*, 2007).

Las *mixobacterias* tienen dos características que nos permiten distinguirlas fácilmente de otras bacterias. La primera es que sus células se mueven deslizando o reptando sobre la superficie o dentro del sustrato. Una segunda característica de las mixobacterias que es única entre las bacterias es que en condiciones de inanición las células comienzan a agregarse dentro del enjambre, se acumulan y producen cuerpos fructíferos (Reichenbach, 2001). La formación de cuerpos fructíferos es inducida por la deficiencia nutricional y es controlada por las

2. Introducción

concentraciones de nutrientes, pH, cationes y temperatura. Es una morfogénesis cooperativa por parte de las células vegetativas enjambradas (Dawid, 2000).

2.7.1 Importancia del metabolismo secundario

Los microorganismos viven en ambientes naturales, donde su crecimiento es afectado tanto por interacciones con otras poblaciones (sinérgicas, antagónicas, etc.) como por las características físicas y químicas de su entorno. Como consecuencia de esas interacciones, se producen metabolitos secundarios con actividades biológicas variadas que juegan un papel importante en su sobrevivencia. En contraste con los metabolitos secundarios producidos por las plantas, cuyo uso contra enfermedades tiene sus raíces en la medicina tradicional, los compuestos de importancia farmacéutica obtenidos de microorganismos son el resultado de intensas investigaciones de la naturaleza como fuente de compuestos bioactivos llevados a cabo por un gran número de laboratorios en todo el mundo. La identificación y caracterización biológica y molecular de microorganismos útiles como agentes de biocontrol, productores de compuestos bioactivos o sustitutos de antibióticos, ha sido de gran interés para la medicina y la agricultura moderna (Evangelista-Martínez *et al.*, 2007).

Se ha sabido que las mixobacterias desempeñan un papel importante en la degradación de macromoléculas insolubles tales como proteínas, celulosa, peptidoglicano, lípidos y ácidos nucleicos, así como células intactas, eucariotas y procariontes, y sus fragmentos subcelulares. Lo hacen gracias a la secreción de una poderosa batería de enzimas hidrolíticas (Shimkets, 2006).

Las mixobacterias son organismos organotróficos y mesófilos estrictamente aeróbicos. Se propagan a 9-38 ° C. Su tiempo de generación se encuentra entre 4 y 12 h. Todas las mixobacterias se caracterizan por su capacidad para degradar las macromoléculas biológicas. Con respecto a la utilización de celulosa, forman dos grupos dependiendo de su capacidad para utilizar compuestos nitrogenados

2. Introducción

inorgánicos. El grupo I (degradadores de celulosa, suborden *Sorangineae*) es capaz de utilizar compuestos inorgánicos de nitrógeno mientras crece en celulosa y glucosa. La formación de celulasa es suprimida por los contenidos más altos de azúcar. El grupo II representa la mayoría de las especies mixobacterianas, que no pueden utilizar celulosa (Dawid, 2000).

3. Justificación

En función de lo discutido en las páginas anteriores, se consideró a las bacterias deslizantes con un potencial enorme de producción de sustancias antimicrobianas ya que al ser de vida libre están en constante competencia con microorganismos de su alrededor y por esta razón probablemente secretan sustancias con actividad antimicrobiana de manera natural. Ello podría permitir identificar y probar que dichas sustancias representan un potencial para la industria alimentaria.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la producción y actividad de sustancias antimicrobianas de diferentes cepas de bacterias deslizantes.

4.2 Objetivos particulares

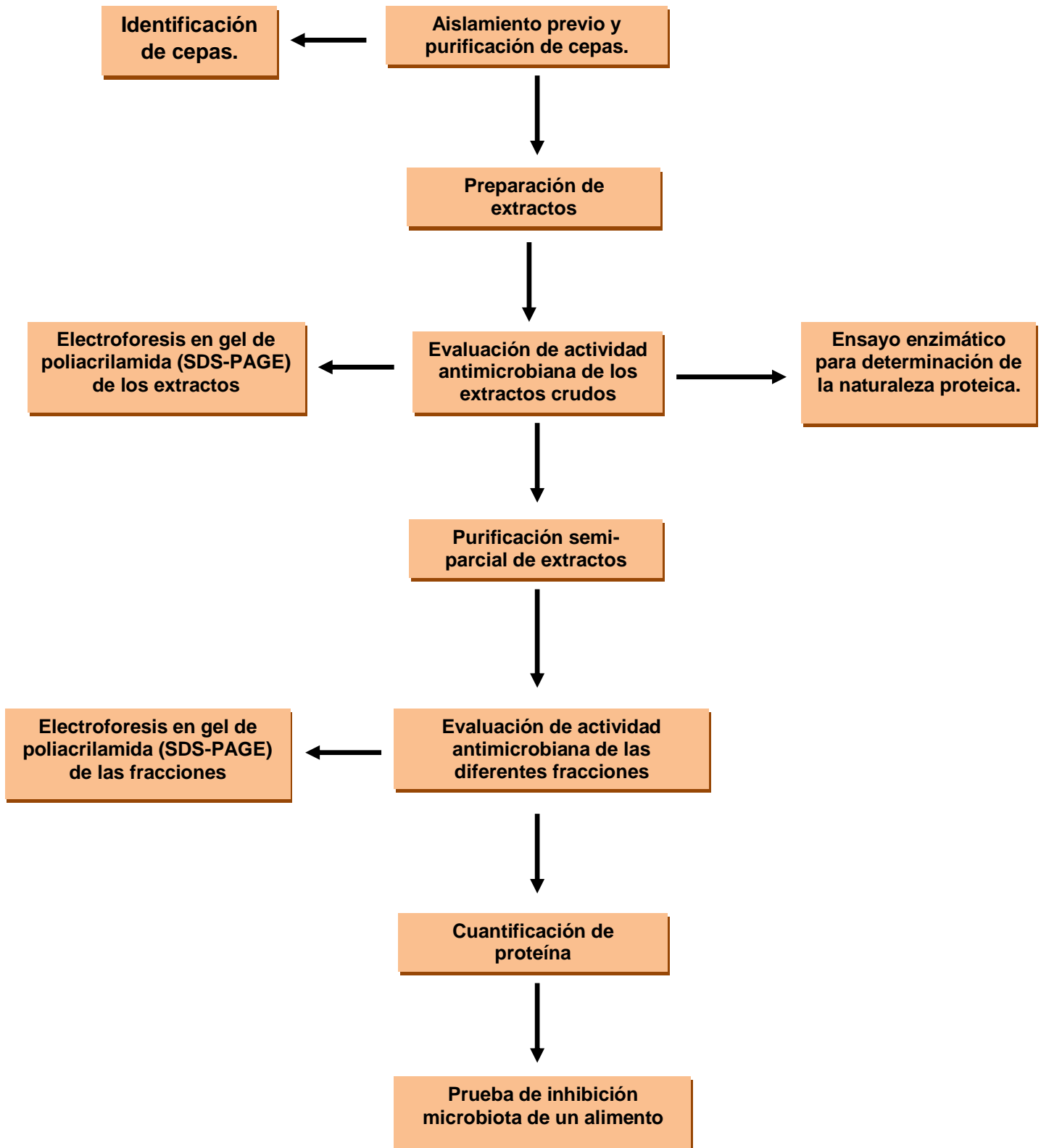
- ✓ Aislar de microorganismos con capacidad productora de sustancias antimicrobianas provenientes de diferentes muestras de suelo.
- ✓ Determinar la actividad antimicrobiana sobre cepas tipo y resistentes a antibióticos.
- ✓ Determinar si dichas sustancias antimicrobianas tienen una naturaleza proteica.
- ✓ Realizar una semi-purificación de dichas sustancias.
- ✓ Determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad bacteriostática sobre la microbiota presente en un alimento (leche bronca).

5. Hipótesis

Cepas de mixobacterias crecidas en condiciones adecuadas serán capaces de producir sustancias análogas a bacteriocinas con actividad bactericida o bacteriostática sobre cepas tipo y actuarán sobre la microbiota original presente en un alimento (leche bronca).

6. Metodología

6.1 Diagrama de Flujo



6. Metodología

6.2 Preparación de muestras ambientales para la obtención de microorganismos productores de sustancias antimicrobianas

Se utilizaron diferentes muestras de tierra provenientes de distintas partes de la zona metropolitana del Valle de México. Estas muestras fueron recolectadas de la superficie hasta antes de los 30 cm de profundidad del punto de muestreo y fueron almacenadas en bolsas estériles para su posterior uso.

Posteriormente, las muestras de tierra fueron cernidas y se sumergieron en una solución de Benomilo [Metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-ilcarbamato] empleando una concentración de 12.5 mg/mL por 1 semana, después se secaron a 27°C por 7 días; una vez secas se guardaron en bolsas estériles hasta su posterior uso a temperatura ambiente.

Las muestras ambientales cernidas de tierra y hojarasca se colocaron en cajas con sílica gel (Ver Anexo), dispuestas en pequeños montones, hidratándose con una solución de medio mineral (Ver Anexo) con cicloheximida en una concentración de 500 g/mL (que es un inhibidor de la síntesis proteica en organismos eucariotas), evitando así la proliferación de hongos y favoreciendo la aparición de los cuerpos fructíferos. Se utilizó papel filtro como única fuente de carbono, ya que la sílica gel es un medio inerte que solo sirve para dar soporte a las muestras.

Las cajas se mantuvieron en una cámara húmeda. A partir del tercer día se realizó el seguimiento de las cajas con un microscopio estereoscópico hasta lograr ver los cuerpos fructíferos o halos de degradación de celulosa. Una vez observados se procedió a fotografiarlos y aislarlos.

6. Metodología

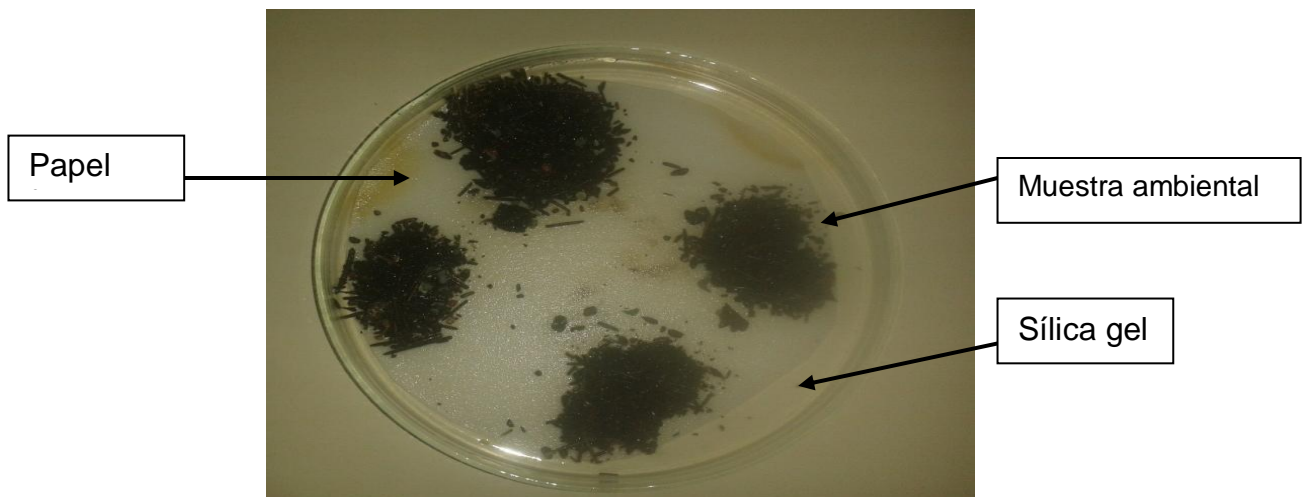


Figura 1. Preparación de muestra ambiental presentando degradación de celulosa

6.2.1 Cepas aisladas antes de este trabajo.

Además de las 5 cepas que se lograron aislar, se trabajó con 11 cepas que ya habían sido aisladas previamente en el laboratorio, provenientes de distintas muestras de suelo urbano y semi-urbano, las cuales se encontraban congeladas en gliceroles a -70°C .

6.3 Aislamiento y purificación de cepas de Mixobacteria

El crecimiento de las mixobacterias se siguió durante 25 días mediante la observación de la aparición de cuerpos fructíferos, tomando en cuenta: color, tamaño, forma, coloración y degradación de papel filtro y tipo de mixoespora y se emplearon las claves de identificación según Reichenbach (1981).

Al identificar los cuerpos fructíferos, se tomó una muestra y se cultivó en un medio selectivo (agar Mc Conkey) que favorece el crecimiento de microorganismos Gram negativos durante 24 horas a 37°C . Dependiendo de la cantidad y tipo de colonias que crecieron en este medio, se realizó una tinción de Gram a cada colonia, y los que resultaron bacilos largos Gram negativos se sembraron hasta la obtención

6. Metodología

de cepas puras. Las colonias puras aisladas se mantuvieron en caldo CY adicionado con peptona (ver Anexo) y glicerol, estas se congelaron a -70°C .

6.3.1 Características Macro y microscópicas de las cepas

a) Características Macroscópicas

Para determinar las características macroscópicas de las cepas, estas se sembraron por radiante cuadrado en cajas con agar CY y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se identificaron las siguientes características: Forma de la colonia, del borde, aspecto, color y consistencia.

b) Características Microscópicas

Para determinar la pureza de las muestras y las características microscópicas de las cepas se les realizó una tinción de Gram. Las características microscópicas registradas fueron morfología celular y reacción a la tinción de Gram

6.4 Preparación de extractos crudos

Cada cepa de Mixobacteria fue sembrada en un tubo con 3 mL de caldo Luria, se sembraron 150 μL de cada cepa proveniente de glicerol congelados a -70°C , estos se incubaron a 24 hrs a 37°C .

Pasadas las 24 hrs se inoculó 1×10^8 células/mL en un matraz Erlenmeyer con 50 mL de caldo Luria, incubándose a 32°C con agitación constante de 150 rpm en una incubadora con agitación orbital durante 1 semana. Transcurrido este tiempo se tomaron 25 mL y se centrifugaron durante 15 minutos a 5000 rpm para separar a las células y recuperar el sobrenadante. Posteriormente, éste se pasó por un Filtro Millipore de 0.22 μm . para eliminar a las posibles bacterias que quedaran en él.

Dicho sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior uso.

6. Metodología

6.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Se seleccionaron 3 cepas tipo identificadas como: *Escherichia coli* ATCC 53868, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella enterica* Typhimurium ATCC 14028 proporcionadas por el cepario de la Facultad de Medicina.

Cada una de estas cepas tipo fue sembrada en un tubo con 3 mL de caldo Luria, siguiendo la metodología de Bauer-Kirby se ajustó las cepas a una densidad de 0.5 unidades de McFarland que equivalen a 1×10^8 células/mL y se incubaron durante 24 hrs a 37°C para tener cultivos jóvenes.

Pasado este tiempo se inocularon 1×10^6 células/mL en cajas con agar Müller-Hinton y se hizo un extendido del inóculo con una varilla de vidrio en "L". Esto con el fin de medir la actividad antimicrobiana de los extractos crudos mediante la formación de un halo de inhibición.

a) Método de difusión en pozos

Después de hacer el extendido en el agar Müller-Hinton, se hicieron pozos de 6 mm de diámetro en la superficie con ayuda de una pipeta Pasteur de vidrio estéril. En cada pozo se colocó 50µL del sobrenadante de las cepas. Se dejaron incubando durante 24 horas a 37°C.

Una vez transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición formados por los extractos crudos.

b) Técnica de difusión en Agar

Después de hacer el extendido en el agar Müller-Hinton, se colocaron discos de papel filtro de 5 mm de diámetro impregnados con cada uno de los sobrenadantes obtenidos. Las cajas se incubaron durante 24 horas a 37°C. Una vez transcurrido este tiempo se midieron los halos de inhibición formados por los extractos crudos.

6. Metodología

6.6 Tratamiento de extractos crudos

Las proteínas presentes en los extractos crudos se precipitaron con un volumen igual de acetona y se colocaron a 0°C durante toda la noche. Transcurrido este tiempo se centrifugaron a 4000 rpm conservando sólo el pellet formado, el cual se secó con ayuda de vacío y posteriormente se resuspendió en 1000 µL de buffer de fosfatos a pH 7 y se almacenó a 4°C hasta su posterior uso.

Nuevamente se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos crudos utilizando el método de difusión en pozos y la técnica de difusión en agar.

6.7 Purificación semi-parcial de extractos crudos

Se realizó una purificación semi-parcial de los extractos que provocaron inhibición del crecimiento de algunas de las cepas tipo.

Los sobrenadantes obtenidos después de tratarlos con acetona se concentraron hasta el mínimo volumen posible utilizando filtros Millipore Amicon (Figura 2) con poros para 3, 10 y 30 KDa. centrifugándose primero en el filtro de 30 KDa a 4500 rpm durante 20 minutos en una centrífuga clínica obteniéndose 2 fracciones, la que queda detenida en el filtro la cual está concentrada y se colecta en un tubo Eppendorf y la fracción que pasa por el poro que no está concentrada y que además es de otro peso molecular. Esta fracción se hace pasar por el siguiente filtro (10 KDa) y se centrifuga en las mismas condiciones. Se repite este procedimiento pero ahora utilizando el filtro de 3 KDa.

6. Metodología

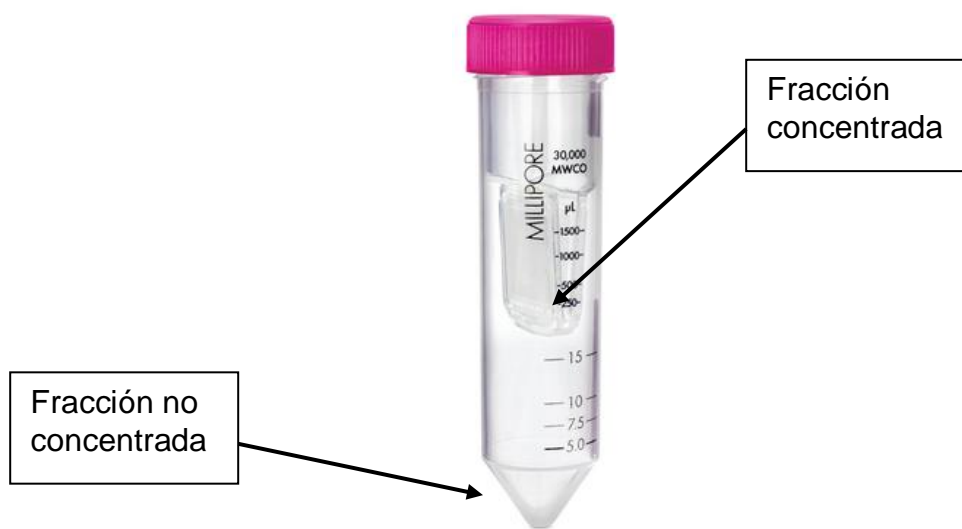


Figura 2. Filtro Millipore Amicon (imagen tomada de la página oficial de Merck)

6.7.1 Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos crudos semi-purificados.

Se utilizó la prueba de difusión en agar para evaluar la actividad antimicrobiana, pero esta vez utilizando los extractos crudos semi purificados de cada cepa. Para esta prueba se utilizaron cepas tipo que fueron, *E. coli* ATCC 53868, *S. aureus* ATCC 25923 y *S. Typhimurium* ATCC 14028. También se utilizó una cepa multirresistente a antibióticos (*Klebsiella oxytoca*) aislada previamente en el laboratorio proveniente del microbioma oral humano.

6.8 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Schägger y Von Jagow, 1987).

Este tipo de electroforesis es muy eficiente en la resolución de proteínas de mediano y bajo peso molecular (entre 100 y 10 KDa). Debido a que los péptidos esperados en los extractos se encuentran en este rango de peso, esta técnica nos permitirá definir mejor a las proteínas que tenemos.

6. Metodología

Se realizaron mini geles de poliacrilamida de 1mm de grosor, los cuales estaban compuestos por una parte separadora que se encontraba al 12% de una mezcla de acrilamida y bis-acrilamida (37.5%:1%) y una porción concentradora al 4% de acrilamida/bis-acrilamida.

Se tomaron 25µL de cada uno de los sobrenadantes colocados en un tubo Eppendorf con 20µL de buffer de carga (12.5% de amortiguador de gel, 1% SDS, 15% glicerol, 0.5% azul de bromofenol, 10mM de DTT y 0.1% de betamercaptoetanol) y se calentaron durante 5 min a 95°C previo a cargarse en el gel.

Estas electroforesis se realizaron en cámaras mini-Protean Tetra cell de Biorad, usando el amortiguador de corrida para cátodo (Tris 0.1M, Tricina 0.1M y SDS 0.1% pH 8.25) y amortiguador de ánodo (Tris-HCl 0.2M pH 8.93); los geles se corrieron a 100V durante aproximadamente 1 hora y media.

Los geles fueron teñidos alrededor de media hora usando una solución al 0.2% de colorante azul de Coomasie R250 (Research Organics) con 47% de etanol y 10% de ácido acético, tras lo cual fueron desteñidos con una solución de 50% metanol y 7.5% de ácido acético hasta obtener el contraste deseado.

Se escanearon los geles obtenidos.

6.9 Determinación de proteína en los sobrenadantes (Peterson, 1977)

Las proteínas de los extractos crudos se concentraron precipitando con acetona a -70°C durante toda la noche. Una vez transcurrido el tiempo se centrifugó y el pellet se resuspendió en buffer tris pH 7.

6. Metodología

Se tomaron 100 μL y se colocaron en un tubo Eppendorf (previamente se preparan los reactivos de Lowry (A:B:C) y el reactivo de Follin, Ver Anexo) a cada muestra problema se le agregan 800 μL de reactivo de Lowry y 100 μL del reactivo de Follin, respetando los tiempos de incubación posteriores a la adición de cada reactivo (10 minutos después de agregar el reactivo de Lowry y 20 minutos después de agregar Follin).

Tanto la curva patrón (Ver Anexos) como las muestras problema se leyeron a 660nm en el espectrofotómetro.

6.10 Acción de la pepsina sobre los posibles péptidos presentes en los diferentes extractos crudos.

Se realizó un ensayo enzimático con la finalidad de saber si lo que estaba presente en los extractos crudos realmente eran proteínas. Para ello se utilizó a la pepsina para degradar a los péptidos y para estimar su actividad se utilizó hemoglobina como control (Técnica de Anson modificada) (Anson, 1938).

a) Preparación de la Hemoglobina

Se preparó una solución de hemoglobina al 2.5% disuelta en agua destilada, agitando vigorosamente al menos 10 min a 37°C. Se centrifugó y descartó el precipitado. A 4 mL del sobrenadante se le añadió 1 mL de HCL 0.3 N; el pH final deberá ser de 1.6.

b) Preparación de la solución de pepsina

Se preparó una solución de pepsina al 0.1% en HCL 0.01 M. antes de utilizar la solución de pepsina se debe diluir dicha solución 1:10 con HCL 0.01M para que la concentración final sea de 0.01%.

6. Metodología

a) Preparación del estándar de tirosina

Se prepararon 10 mL de estándar de tirosina que contenga 0.008 miliequivalentes de tirosina en 5 mL con NaOH 0.5N. Utilizando distintas cantidades del estándar para construir la curva (Anexo). Se preparó un blanco con NaOH 0.5N.

b) Digestión de la hemoglobina

Se colocaron 4 alícuotas de 2 mL de solución de hemoglobina ácida, cada una en un tubo de ensayo, a cada uno se le agregaron 0.8 mL de solución de pepsina y se incubaron a 37°C. La reacción se detuvo a los 15, 30, 45 y 60 min. agregando 4 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0.3N, se agitó vigorosamente y se centrifugó durante 5 min a 5000rpm.

Se tomaron 2.5 mL del sobrenadante y se le añadió 5mL de de NaOH 2N y 1.5 mL de solución de fenol (Reactivo de Folin diluido 1:3). Después de la adición de fenol se debe agitar y dejar reposar en oscuridad durante 10 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 600 nm.

c) Digestión de extractos crudos

Se tomaron 5 mL del extracto, se le agregó 5 mL de acetona y se guardó a 0°C para precipitar a las proteínas presentes. Se centrifugó la muestra y se deshecho el sobrenadante; el pellet formado se resuspendió en 5 mL de agua destilada y se le adicionó 1.5 mL de HCl 0.3N para llevar el pH de a 1.6.

Una vez que se ajustó el pH se le adicionó 0.8 mL de la solución de pepsina y se incubó por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se le añadió 5mL de de NaOH 2N y 1.5 mL de solución de fenol (Reactivo de Folin diluido 1:3). Después de la adición de fenol se debe agitar y dejar reposar en oscuridad durante 10 min. Posteriormente se leyó la absorbancia a 600 nm.

6. Metodología

Después de realizar la digestión de los extractos, estos se probaron para observar si aún tenían actividad inhibitoria sobre otras cepas utilizando la técnica de Bauer-Kirby (Difusión en agar) y se corrió un gel de poliacrilamida SDS/PAGE para ver si había un cambio en las bandas que se presentaban antes y después de la digestión.

6.11 Prueba de inhibición de la microbiota presente en un alimento

a) Toma de muestra

Para la obtención de muestra de leche hay que seguir ciertos procedimientos de asepsia (Martínez-López *et al*, 2011), para evitar la contaminación con microorganismos que provengan de alguna fuente distinta a la leche. La muestra fue obtenida de un establo de la colonia Sta. Cecilia, Tlahuac. La toma se realizó de la siguiente manera:

1. Los pezones se lavan con solución desinfectante de cloro al 0.2%, se secan perfectamente con toallas desechables, después se eliminan los primeros chorros de la leche con el propósito de evitar residuos contaminantes (Martínez-López *et al*, 2011).
2. Fue necesario utilizar guantes para evitar algún tipo de contaminación
3. La muestra de leche recolectada se colocó en un matraz de 250 mL estéril, aproximadamente se recolectaron 200 mL de leche.
4. El matraz se colocó en una hielera la cual contenía hielo con la finalidad de mantener a la leche a una temperatura baja.

6. Metodología

5. Se recomienda que el tiempo entre la toma de muestra y el análisis de la misma no sea mayor a 4 horas y la temperatura de la misma debe estar siempre por debajo de los 5°C (Martínez-López *et al*, 2011).

b) Prueba de reductasa

Se tomaron alícuotas de 10 mL y se colocaron en tubos de ensaye, a cada tubo se le adicionaron 500µl de extracto crudo y se dejaron incubando durante una hora a 37°C. Pasado este periodo de incubación se adicionó a cada tubo 1 mL de azul de metileno y se incubaron a 37°C. Se realizó un tubo control al cual se le dio el mismo tratamiento que a los tubos que contenían el extracto obtenido. Los tubos se observaron cada media hora hasta que todos los tubos perdieron la coloración azul.

El tiempo que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolora) bajo condiciones controladas es proporcional a la calidad sanitaria de la leche, es factible clasificar el producto dentro de ciertos grados aceptables o no aceptables, con base a los siguientes valores (Información tomada de la guía práctica “Introducción al control de calidad de la leche cruda”):

Tabla 1. Calidad de la leche con respecto al tiempo en horas que tarda en pasar el azul de metileno de su forma oxidada (azul) a la reducida (incolore).

Calidad de la leche	Tiempo en horas
Buena a excelente	Más de 8
Regular a buena	6 – 8
Regular	2 – 6
Mala	Menos de 2

6. Metodología

6.12 Determinación de UFC por dilución y vertido en placa para verificar si existe alguna diferencia en la carga microbiana de la leche.

El fin de esta técnica es la obtención de “unidades formadores de colonia” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra.

Para realizar esta técnica se prepararon 5 tubos con 9 ml de solución salina estéril cada uno. Una vez transcurrida la hora de incubación de las muestras de leche y antes de la adición del azul de metileno se toma 1 mL de la muestra de leche más la bacteriocina y se adiciona en el primer tubo con solución salina. Posteriormente se toma 1 mL de este tubo y se pasa al siguiente tubo con solución salina y así haciendo diluciones sucesivas.

De cada dilución se tomó 1 mL y se depositó en una caja estéril, posteriormente se le agregó a la caja 15 mL de Agar cuenta en placa previamente esterilizado y enfriado. Se homogenizó la muestra con el agar y se dejó solidificar.

Las cajas se incubaron a 37°C durante 24 hrs, Una vez transcurrido este tiempo se procedió a contar las colonias presentes en las cajas, colonias que presentaron una coloración amarilla o blanca y que tuvieran un tamaño de aproximadamente 4-5mm de diámetro. Se contaron todas las colonias presentes en cada dilución pero para las UFC se consideraron solo las que estaban dentro del rango de 25 a 250 UFC. Esta técnica se hizo por duplicado para cada tubo.

7. Resultados y discusión

7.1 Aislamiento y purificación de cepas de Mixobacterias.

Se trabajó con muestras de tierra de diferentes zonas de la CDMX, Veracruz, Coahuila, etc., las cajas se monitorearon durante cuatro semanas buscando la formación de cuerpos fructíferos (Figura 3), los cuales se observaron y clasificaron con base en la claves de Reichenbach (1981). La forma de los cuerpos fructíferos puede dar una idea de la familia a la que pueden pertenecer. Se tomó parte del cuerpo fructífero para cultivar las mixoesporas y crecerlas *in vitro*, en las condiciones adecuadas.

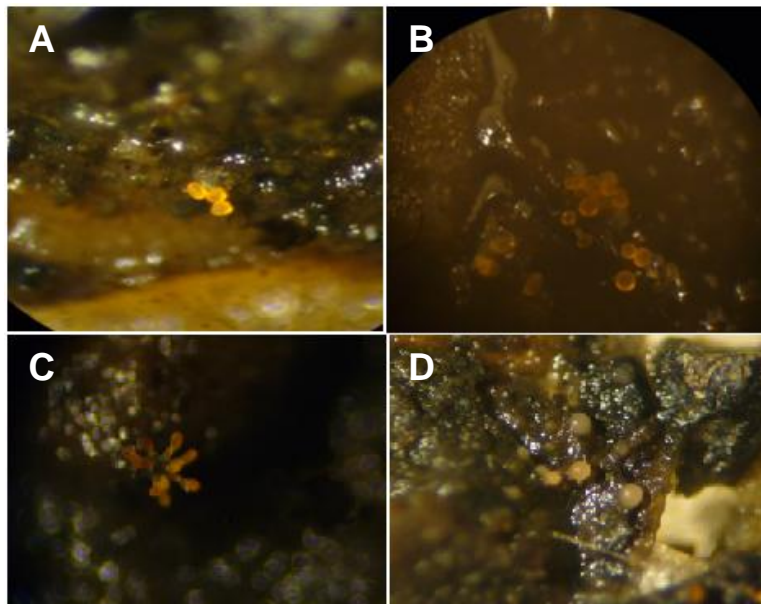


Figura 3. Formación de diferentes cuerpos fructíferos encontrados en muestras de tierra. A) Cuerpo fructífero correspondiente al género *Myxococcus*. B) Cuerpo fructífero de *Chondromyces* C) Cuerpo fructífero de *Stigmatella* y D) Cuerpo fructífero de *Polyangium*.

Se lograron obtener distintas *Mixobacterias* las cuales correspondían a distintos géneros, por ejemplo:

- ✓ *Myxococcus*: normalmente forman pequeños sacúlos de diferentes colores brillantes, blandos y viscosos que pueden crecer en el papel filtro o en pedazos de madera

7. Resultados y discusión

- ✓ *Polyangium*: este género solo crece en material orgánico. Color blanco
- ✓ *Stigmatella*: un género difícil de encontrar, sus esporangios son de forma ovoide y con un tallo en forma de flor
- ✓ *Chondromyces*: esporangios en la parte superior de un tallo sin ramificaciones

En total se aislaron 5 cepas provenientes de diversas muestras de suelo. También se trabajó con cepas que ya habían sido aisladas previamente en el laboratorio. En total se trabajó con 16 cepas puras de Myxobacteria, las cuales se colocaron en agar Mc Conkey y caldo CY. En la tabla 2 y 3 se muestran las nomenclaturas de las cepas utilizadas, así como del género de cada una.

Tabla 2. Géneros de mixobacterias pertenecientes a la colección del laboratorio

Cepa	Género	Cepa	Género
JS	<i>Stigmatella</i> sp.	H2	<i>Stigmatella</i> sp.
Mx	<i>Myxococcus</i> sp.	91g	<i>Myxococcus</i> sp.
CU	<i>Stigmatella</i> sp.	30	<i>Myxococcus</i> sp.
3980	<i>Myxococcus</i> sp.	8D	<i>Myxococcus</i> sp.
30	<i>Stigmatella</i> sp.	92F	<i>Myxococcus</i> sp.
ya-1	<i>Sorangium</i> sp.		

Tabla 3. Géneros de mixobacterias de reciente aislamiento

Cepa	Género	Cepa	Género
1	<i>Myxococcus</i> sp.	4	<i>Stigmatella</i> sp.
2	<i>Myxococcus</i> sp.	5	<i>Polyangium</i> sp.
3	<i>Chondromyces</i> sp.		

7. Resultados y discusión

Del total de cepas trabajadas la mayoría pertenecían al género *Myxococcus* (53%), seguido de *Stigmatella* (29%) y finalmente los géneros *Sorangium*(6%), *Chondromyces* (6%) y *Polyangium* (6%).

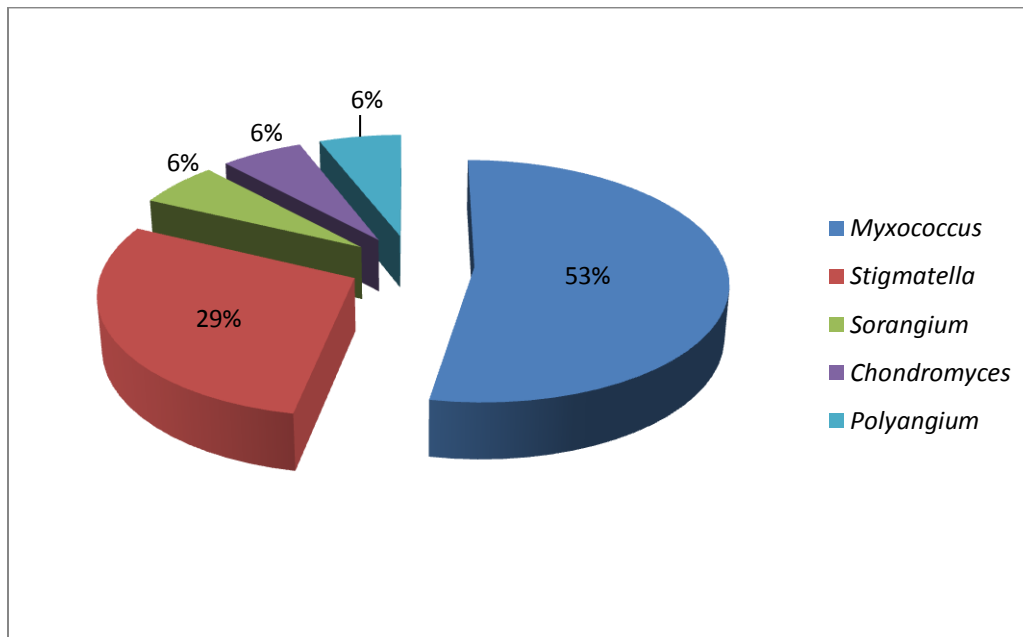


Gráfico 1. Porcentaje de los géneros de mixobacterias trabajadas

El género *Myxococcus* es el que más se ha aislado en el laboratorio, seguido del género *Stigmatella* estos dos géneros son los que se encuentran con mayor frecuencia en el suelo según Dawid (2000).

7.2 Características macro y microscópicas de las cepas

Para evaluar las características microscópicas de las cepas se realizó una tinción de Gram con la cual se comprobó que todas las muestras trabajadas fueran bacilos largos Gram negativos, ya que esta es la morfología típica de las Myxobacterias (Shimkets, 2006). Además, con esto se corroboró la pureza de las cepas seleccionadas.

7. Resultados y discusión

En la tabla 4 se muestran las características coloniales de las cepas en agar CY.

Tabla 4. Características morfológicas coloniales de las cepas seleccionadas

Cepa	Forma	Borde	Elevación	Textura	Color
JS	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Blanquecino
MX	Puntiforme	Entero	Elevada	Butirosa	Blanquecino
CU	Circular	Entero	Elevada	Butirosa	Blanquecino
3980	Puntiforme	Entero	Plana	Butirosa	Blanquecino
30	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
8D	Puntiforme	Entero	Elevada	Butirosa	Blanquecino
92F	Circular	Ondulado	Elevada	Butirosa	Blanquecino
ya-1	Puntiforme	Entero	Elevado	Butirosa	Blanquecino
H2	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
91g	Circular	Entero	Convexa	Butirosa	Blanquecino
30	Circular	Entero	Elevado	Butirosa	Amarilla
1	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
2	Circular	Entero	Convexa	Viscosa	Blanquecino
3	Puntiforme	Entero	Elevado	Butirosa	Blanquecino
4	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Blanquecino
5	Circular	Entero	Convexo	Butirosa	Blanquecino

La mayoría de las colonias de las cepas fueron circulares, con bordes enteros, blanquecinas y con una textura butirosa, estas características son las que presentan normalmente una colonia de mixobacteria (Shimkets, 2006).

7. Resultados y discusión

7.3 Evaluación de la posible actividad antimicrobiana

De cada cepa se obtuvieron alrededor de 25 mL de extracto crudo. Los 16 extractos crudos se mantuvieron en refrigeración hasta su uso.

Se evaluó la posible actividad antimicrobiana de los 16 extractos crudos sobre diferentes cepas tipo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC53868, y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), pero ninguno de los 16 extractos inhibió a las cepas tipo. Esto pudo deberse a que la cantidad de proteína presente en los extractos era muy baja ya que la producción de los péptidos puede verse afectada por condiciones del medio y esto provocar una disminución en la concentración de la proteína (Shimkets, 2006), por este motivo se concentró a la proteína haciéndola precipitar con acetona y manteniéndola a una baja temperatura.

Después de haber re-suspendido a la proteína en buffer se repitió la técnica de difusión en agar y de difusión en pozos para ver si en esta ocasión se provocaba la inhibición de las diferentes cepas tipo. En esta ocasión se lograron observar que algunos de los extractos habían formado halos de inhibición sobre las cepas tipo que se utilizaron (Figura 4).

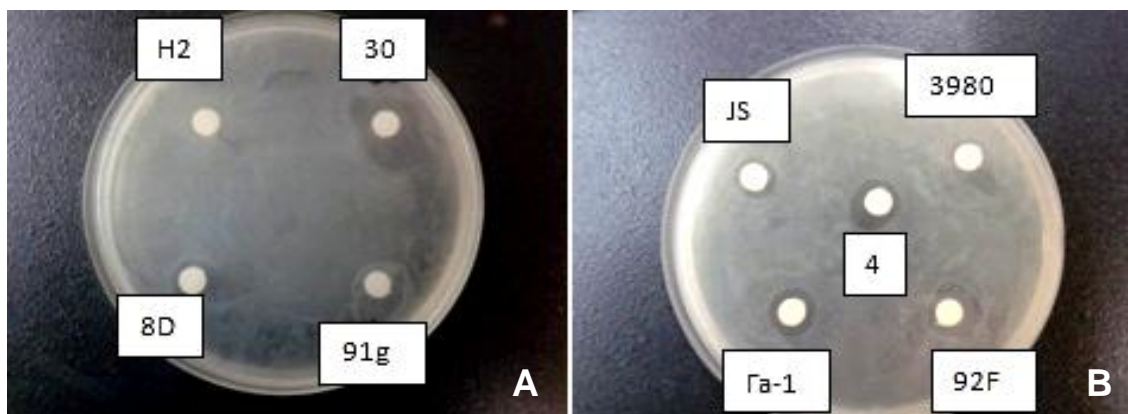


Figura 4. Halos de inhibición producidos por los extractos crudos concentrados de diferentes bacterias deslizantes sobre cepas tipo. A) Halos de inhibición formados sobre *S. aureus* ATCC 25923. B) Halos de inhibición formados sobre *E. coli* ATCC 53868.

7. Resultados y discusión

De las dos técnicas utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana, fue la prueba de difusión en agar la que presentó resultados positivos y fue la técnica que se siguió utilizando para pruebas posteriores.

De los 16 extractos, sólo 11 inhibieron a alguna de las cepas tipo formando halos de distintos tamaños (Tabla 5).

Tabla 5. Diámetros de los halos de inhibición de los extractos precipitados con acetona sobre distintas cepas tipo

Cepa	Género	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>E. coli</i> ATCC 53868	<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028
H2	<i>Stigmatella</i> sp.	-	7 mm	-
30	<i>Stigmatella</i> sp.	13 mm	7 mm	7 mm
8D	<i>Myxococcus</i> sp.	7 mm	-	-
91g	<i>Myxococcus</i> sp.	7 mm	-	7 mm
JS	<i>Stigmatella</i> sp.	-	7 mm	-
3980	<i>Myxococcus</i> sp.	-	6 mm	7 mm
4	<i>Stigmatella</i> sp.	7 mm	10 mm	7 mm
92F	<i>Myxococcus</i> sp.	-	10 mm	-
ya1	<i>Sorangium</i> sp.	7 mm	10 mm	-
MX	<i>Myxococcus</i> sp.	6 mm	-	-
CU	<i>Stigmatella</i> sp.	-	-	6 mm

E. coli fue la cepa que presentó más sensibilidad a los distintos extractos crudos, fue inhibida por 7 de los 11 extractos que inhibieron a alguna cepa, siendo los extractos de las cepas 4, 92F y ya1 los que mejor efecto tuvieron al momento de inhibir a esta cepa, causando halos de 10 mm de diámetro.

7. Resultados y discusión

En el caso de *S. aureus* fueron 6 los distintos extractos que lograron inhibir su crecimiento, siendo el extracto de la cepa 30 el que mejor logró inhibir su crecimiento provocando un halo de 13 mm.

Finalmente, *S. Typhimurium* fue la cepa que menos inhibiciones presentó por presencia de los extractos, solo 5 extractos lograron inhibirla y los halos no superaron los 7 mm de diámetro que formaron los extractos de las cepas 30, 91g, 3980 y 4.

Los extractos de las cepas 4 y 30 (ambas del género *Stigmatella*) fueron los que formaron mayores halos de inhibición sobre alguna cepa tipo y los que lograron inhibir el crecimiento de las 3 cepas.

7.4 Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS/PAGE) de los extractos crudos.

Para comprobar la presencia de proteínas en los extractos que fueron precipitados con acetona de las diferentes cepas que pudieran ser las causantes de la inhibición se realizó una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Figura 5). Se colocó el extracto crudo de cada cepa en un carril y se pudo observar la presencia de más de una banda, todas por debajo de los 100 KDa.

7. Resultados y discusión

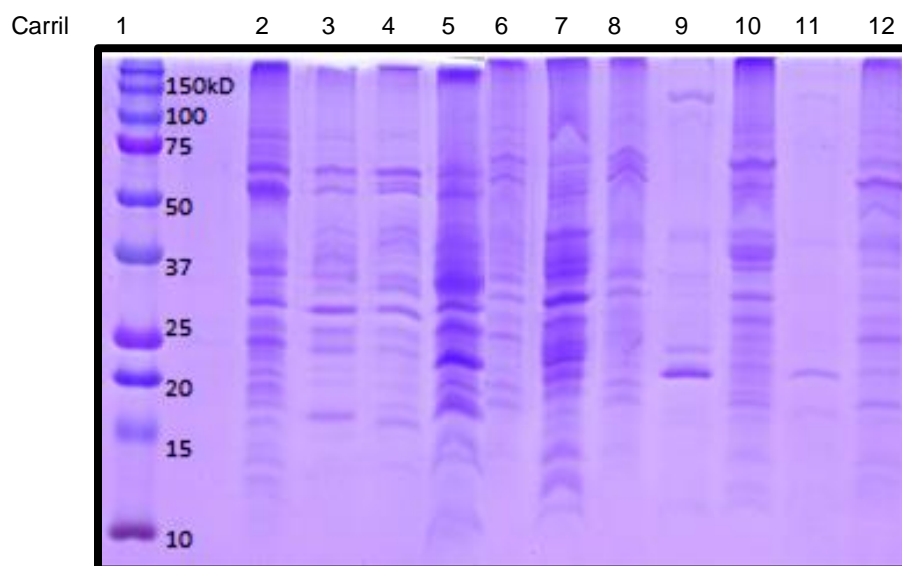


Figura 5. Electroforesis en gel SDS-PAGE de los sobrenadantes de cada cepa. Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) cepa 30, 3) cepa 91g, 4) cepa 4, 5) cepa 92F, 6) cepa ya1, 7) cepa 3980, 8) cepa H2 9) cepa 8D, 10) cepa JS, 11) cepa MX 12) cepa CU

En el caso del carril 11 (MX) solo se aprecia una banda definida alrededor de los 20 KDa. En el caso del carril 9 (8D) presenta una banda definida alrededor de 20KDa y otra banda de un peso aproximado de 24 KDa.

Los carriles 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 10 presentan una banda con un peso alrededor de los 30KDa, estas mismas cepas presentan 2 bandas entre 50 y 75 KDa. Pese a la presencia de estas bandas definidas en los carriles de estas muestras, todas presentan distintas bandas que están por debajo de los 25 KDa. Hasta este momento no podríamos determinar cuál o cuáles de ellas podrían ser las que parecen tener actividad antimicrobiana, ya que en la literatura se reporta que existe un gran número de proteínas producidas por los distintos géneros de mixobacterias y aunque en su mayoría no han sido caracterizados, se sabe que muchos de estas sustancias son péptidos de peso molecular menor a los 100 KDa (Reichenbach, 2001).

7. Resultados y discusión

7.5 Evaluación de la actividad antimicrobiana de sobrenadantes semi-purificados sobre cepas tipo y una cepa multiresistente a antibióticos.

Se procedió a realizar una semi-purificación de los extractos con el fin de separar a las proteínas presentes por tamaños. Se utilizaron tubos Millipore Amicon con membranas con poros de diferentes tamaños (3, 10 y 30 KDa) y centrifugando las muestras en dichos tubos se obtuvieron las distintas fracciones. Se probó la actividad antimicrobiana de cada fracción con cepas tipo (*Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *E. coli* ATCC53868, y *S. aureus* ATCC 25923) utilizando la técnica de Kirby-Bauer.

De los 11 extractos que habían causado inhibición solamente las fracciones de 5 cepas causaron halos de inhibición sobre las cepas tipo. Los otros seis extractos que habían inhibido a las cepas aparentemente perdieron su efecto antimicrobiano. Esto podría deberse a que hay un efecto de sinergismo provocado por la presencia de los péptidos de distintos tamaños y que al estar separados este efecto antimicrobiano se pierde. En la literatura se ha demostrado este efecto de sinergismo con bacteriocinas que son utilizadas en la industria alimentaria producidas por bacterias ácido-lácticas (Mulet-Powell *et. al.*, 1998).

7. Resultados y discusión

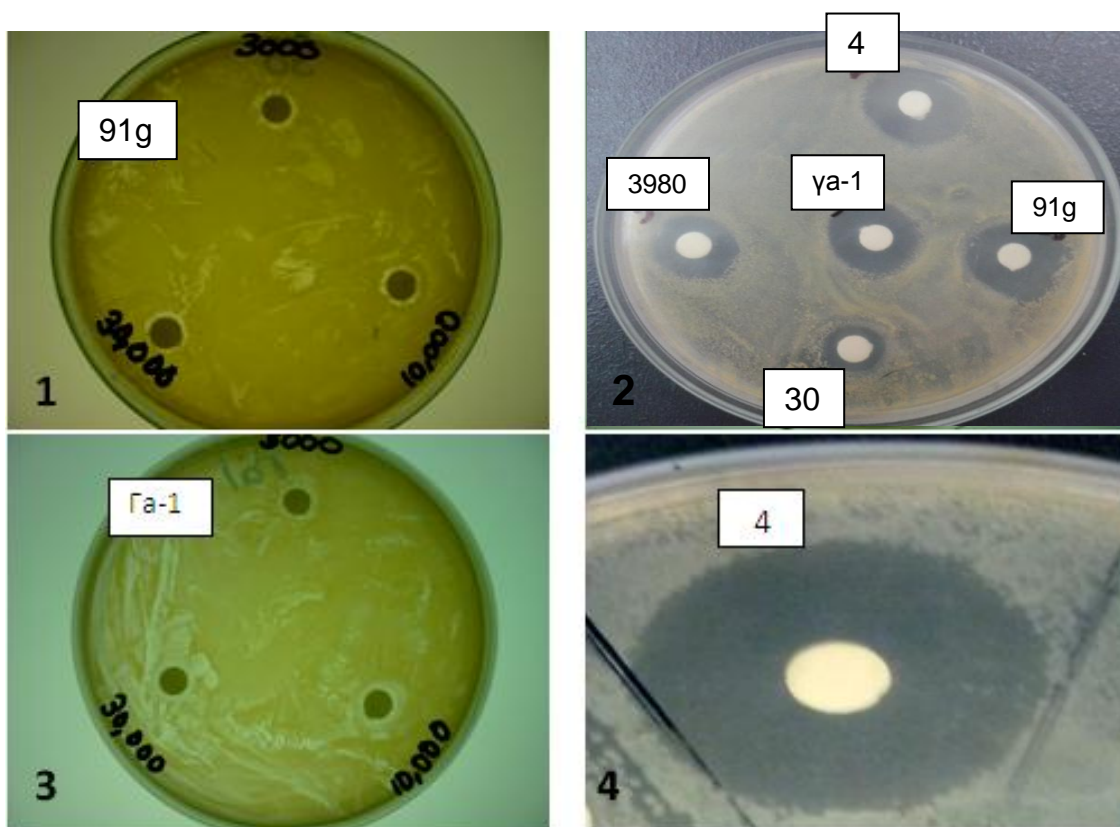


Figura 6. Halos de inhibición producidos por los concentrados obtenidos de cada filtro Amicon de cada extracto (1) Halos de inhibición de la muestra 91g sobre *E. coli* ATCC 53868. (2) Halos de inhibición formados por las fracciones de 10 KDa de las muestras 4, 3980, 91g, 30 y γ a-1 sobre *S. aureus* ATCC25923. (3) Halos de inhibición de la muestra γ a-1 sobre *E. coli* ATCC53868. (4) Halo de inhibición de la muestra 4 sobre *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028.

Tabla 6. Diámetros de los halos de inhibición de los extractos semi-purificados sobre distintas cepas tipo.

Cepa	<i>S. aureus</i> ATCC 25923			<i>E. coli</i> ATCC 53868			<i>S. Typhimurium</i> ATCC14028		
	3 KDa	10 KDa	30 KDa	3 KDa	10 KDa	30 KDa	3 KDa	10 KDa	30 KDa
30	7.5 mm	9 mm	7 mm	-	7 mm	-	-	7 mm	-
91g	-	13 mm	-	6 mm	6 mm	6 mm	-	-	6 mm
4	-	14 mm	-	-	7 mm	6 mm	-	21 mm	-
γ a1	-	14 mm	-	7.5 mm	7 mm	6 mm	-	6 mm	-
3980	-	11 mm	-	-	6 mm	-	-	-	-

7. Resultados y discusión

En la figura 6 se muestran los halos de inhibición producidos por los diferentes concentrados de las diferentes cepas trabajadas. En estos halos podemos apreciar que al separar el extracto y obtener las 3 fracciones, estas en su mayoría provocan una inhibición de las cepas tipo utilizadas provocando halos de distintos diámetros (Tabla 6). En el caso de la muestra 30 se observan halos de inhibición en los 3 concentrados sobre *S. aureus* ATCC 25923. Los tres concentrados provocaron halos de entre 7 y 9 mm de diámetro; Y en el caso de las cepas 4, 91g, 3980 y ya1 solo la fracción correspondiente a 10 KDa inhibió el crecimiento de *S. aureus* causando halos de entre 11 y 14 mm siendo el de la fracción de 3980 el de 11 mm y el de la cepa 4 y ya-1 los mas grandes de 14 mm. En estos casos se puede observar un ligero crecimiento donde se encuentran los halos de inhibición lo cual nos sugiere que estos péptidos están actuando como bacteriostáticos sobre *S. aureus* esto puede deberse a que la cepa cuenta con algún mecanismo de resistencia el cual le permite crecer (Téllez, 2010).

En el caso de las fracciones probadas sobre *E. coli* ATCC 53868, fueron las de las cepas 91g y ya1 las que inhibieron mejor su crecimiento ya que las fracciones correspondientes a cada cepa actuaron sobre el crecimiento de *E. coli*. Las fracciones de 10 KDa de las cepas 3980 y 30 fueron las que inhibieron a esta bacteria y en el caso de la cepa 4 solo las fracciones de 10 y 30 KDa inhibieron a *E. coli*. En los halos formados sobre *E. coli*, también se observaba una pequeña capa de crecimiento bacteriano, lo cual nos indica que las fracciones también están actuando como bacteriostáticos.

Finalmente, *Salmonella* Typhimurium ATCC14028 fue la cepa que menos se inhibió por las diferentes fracciones. Ninguna fracción de 3 KDa la inhibió y de 30 KDa solo la fracción de la cepa 91g causó un halo de 6 mm. Las fracciones de 10 KDa de las cepas 30 y ya1 causaron pequeños halos de inhibición actuando como bacteriostáticos contra la cepa, al igual que la fracción de la cepa 91g. La cepa 4 en su fracción de 10 KDa fue la única que causó un halo de inhibición de 21 mm con un efecto bactericida sobre la cepa.

7. Resultados y discusión

Debido a que los extractos se habían probado sobre cepas que eran sensibles a antibióticos nos pareció interesante probar dichos extractos sobre una cepa que hubiera desarrollado el fenómeno de multiresistencia a antibióticos la cual puede ser más difícil de combatir.

Para la cepa multiresistente a antibióticos, se trabajó con una cepa que se aisló en el laboratorio previamente del microbioma oral humano, se trata de la cepa *Klebsiella oxytoca* y es resistente a 7 antibióticos distintos

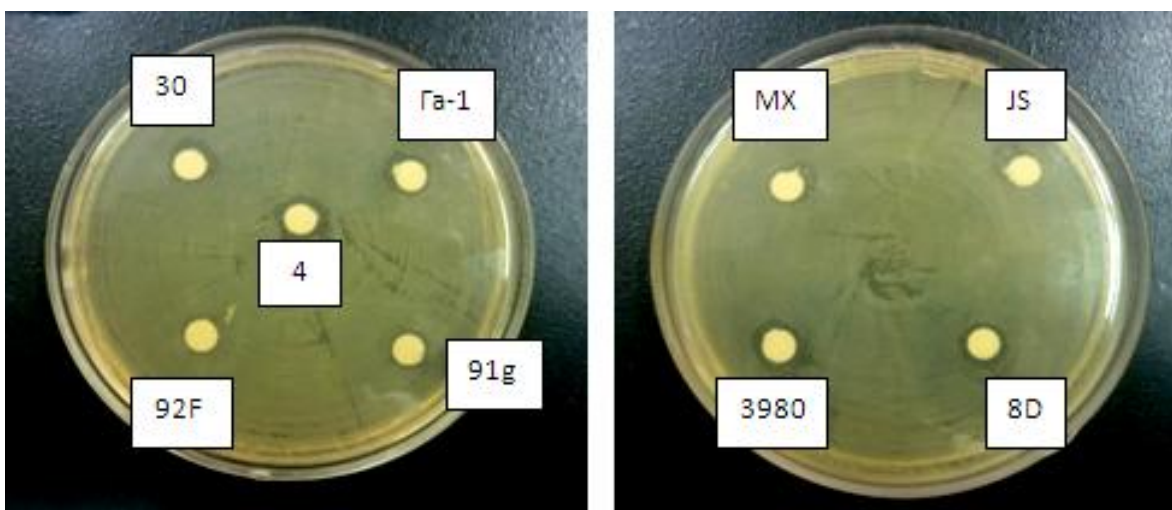


Figura 7. Halos de inhibición producidos por el concentrado de 10 KDa de los extractos semi-purificados sobre una bacteria multiresistente a antibióticos (*Klebsiella oxytoca*).

Tabla 7. Diámetros de los halos de inhibición de los extractos semi-purificados sobre una bacteria multiresistente a antibióticos (*Klebsiella oxytoca*).

Cepa	<i>Klebsiella oxytoca</i>
30	7.5 mm
4	8 mm
91g	6 mm
3980	7.5 mm
ya1	7 mm
8D	7 mm

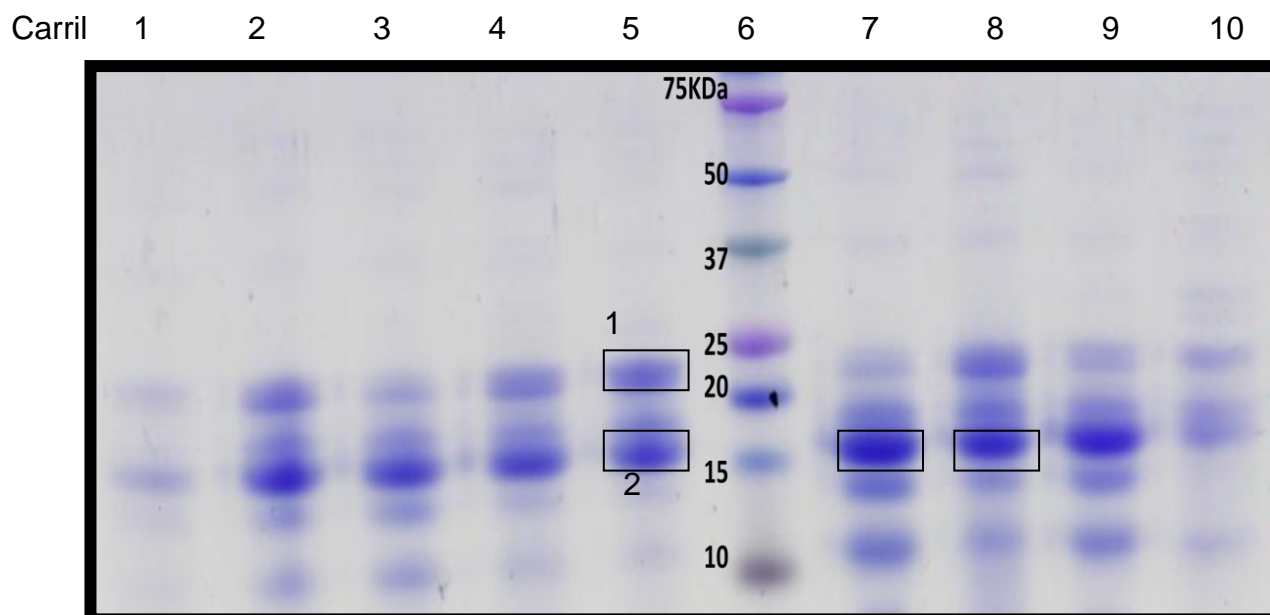
7. Resultados y discusión

De todos los extractos semi-purificados utilizados, las fracciones correspondientes a 3 y 30 KDa no inhibieron a la bacteria multirresistente, sólo algunas fracciones de 10 KDa lograron inhibirla (Figura 7), fueron las fracciones correspondientes a las cepas 30, 4, 91g, 3980, γ a1 y 8D las que inhibieron. En este caso, los halos de las cepas 4, 3980 y γ a1 mostraron un efecto bactericida sobre la cepa, mientras que las cepas 30, 91g y 8D mostraron un efecto bacteriostático esto puede deberse a que la cepa cuenta con algún mecanismo de resistencia el cual le permite crecer (Téllez, 2010).

7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de los extractos semi purificados.

Se realizó un gel de poliacrilamida (Figura 8) utilizando algunas de las fracciones de proteínas para determinar el peso molecular de algunas de las proteínas (ver Anexo peso molecular de las bandas encerradas en recuadros) que teníamos en la muestra. Se decidió utilizar las muestras correspondientes al concentrado que contenía proteínas de entre 10 a 30 KDa, ya que estas fueron las que presentaron mayor inhibición en todas las cepas.

7. Resultados y discusión



En este gel se puede observar que todas las cepas productoras de sustancias antimicrobianas presentan proteínas cercanas a 15 KDa, además de presentar bandas de peso molecular de 10 KDa. Podemos apreciar que esas bandas tienen una mayor intensidad en el gel, lo que nos indica que esas proteínas se encuentran en mayor proporción en el sobrenadante. No podemos determinar cuál de las bandas es la responsable de la inhibición ya que podría existir sinergismo (Mulet-Powell *et. al.*, 1998) entre las proteínas y esto provocaría la inhibición.

7.7 Determinación de proteína en los extractos crudos

Para determinar la cantidad de proteína presente en los extractos crudos se utilizó el método de Lowry (Peterson, 1977). Se le determinó la cantidad de proteínas a las 5 cepas que inhibieron mejor a las cepas tipo y a la cepa multirresistente a antibióticos y se obtuvieron los siguientes resultados:

7. Resultados y discusión

Tabla 8. Cantidad de proteína presente en cada muestra

Cepa	mg/mL
Γa1	26.23
30	31.08
4	38.07
91g	17.88
3980	21.27

Las cepas 4 y 30 fueron las que presentaron una mayor cantidad de proteína. Estas mismas cepas fueron las que mejor inhibición causaron sobre las cepas utilizadas. Esto podría significar que mientras mayor sea la cantidad de péptidos antimicrobianos presentes en el extracto, mayor será la inhibición de las cepas tipo.

7.8 Acción de la pepsina sobre extractos crudos

Para determinar que la actividad inhibitoria de los extractos crudos se debía a la presencia de péptidos se realizó un ensayo enzimático para degradar a dichos péptidos. En este caso se utilizó a la pepsina, enzima digestiva que se encarga de la degradación de proteínas en el estómago. Esta enzima tiende a atacar a los enlaces peptídicos en los cuales se encuentran aminoácidos aromáticos, principalmente tirosina.

Después de tratar los extractos crudos con la pepsina, se cuantificó la cantidad de tirosina libre en el medio ya que la presencia de tirosina en el medio estaría confirmando la naturaleza proteica de los extractos crudos.

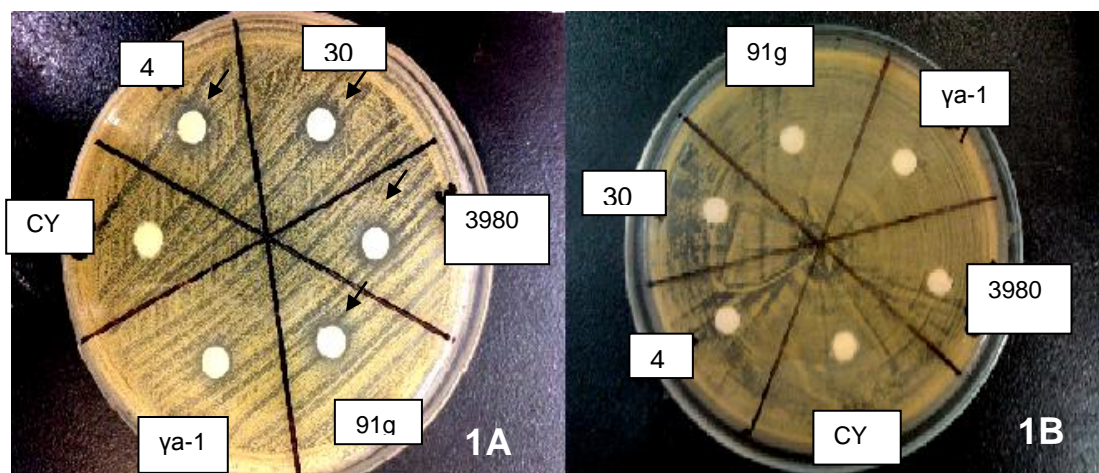
7. Resultados y discusión

Tabla 9. Concentración de tirosina libre presente en los extractos crudos después de tratarse con pepsina

Muestra	[Tyr] μmol/mL
4	0.011
30	0.011
91g	0.020
γa1	0.010
3980	0.011

Los valores de concentración de tirosina obtenidos (Tabla 9) son muy bajos, pudiendo esto deberse a que no hay mucha tirosina en los péptidos presentes en los extractos.

Después de haber tratado a las muestras con pepsina se probó si había algún efecto inhibitorio de los sobrenadantes sobre cepas tipo (*S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella Typhimurium*)



7. Resultados y discusión

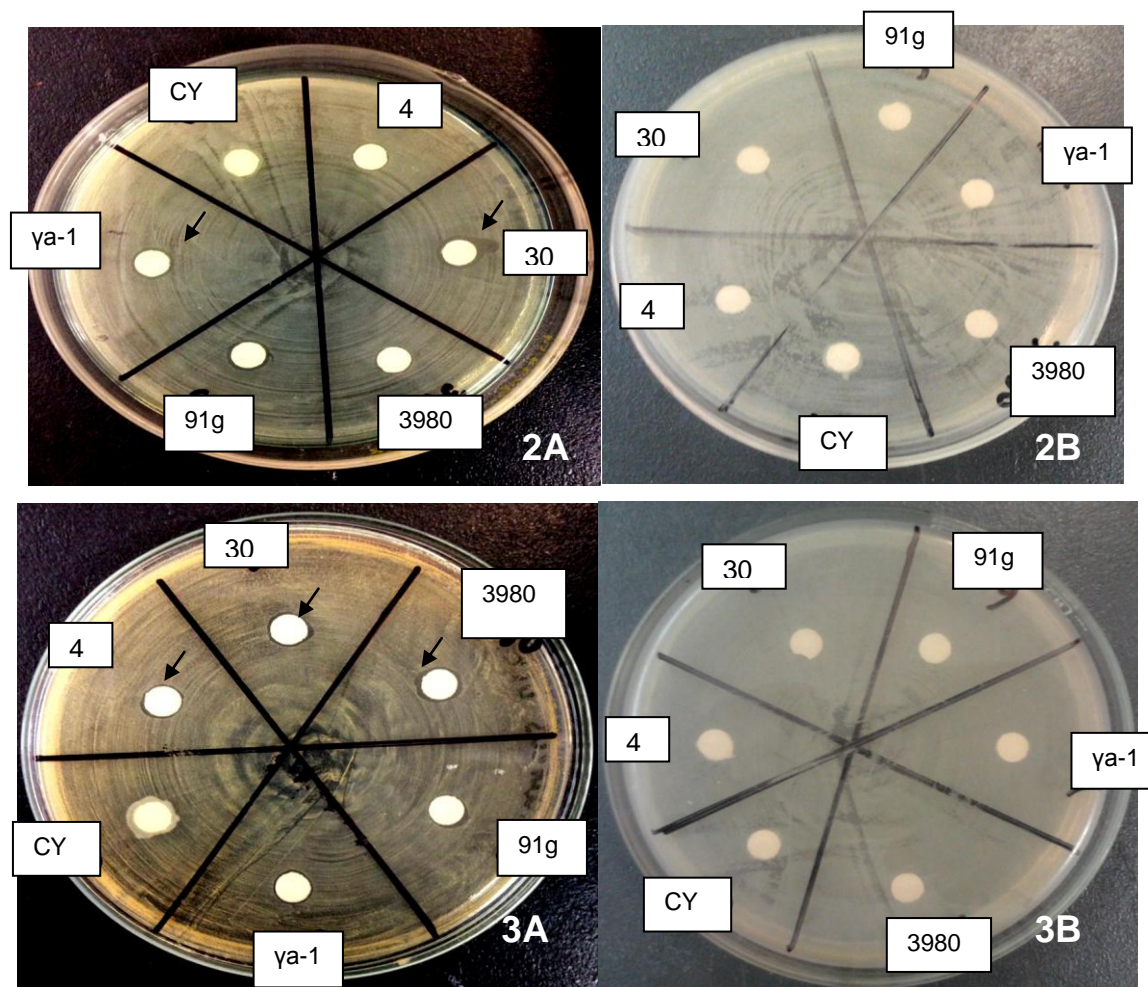


Figura 9. Comparación entre los extractos crudos tratados con pepsina y sin tratar. El número 1 corresponde a la cepa *S. aureus* ATCC 25923 a) Caja con sobrenadantes sin tratar B) Caja con extractos tratados con pepsina. 2 corresponde a *E. coli* ATCC 53868 a) Caja con sobrenadantes sin tratar B) Caja con extractos tratados con pepsina. 3, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 a) Caja con sobrenadantes sin tratar B) Caja con extractos tratados con pepsina.

Se puede observar que los extractos tratados con pepsina ya no inhiben a las cepas tipo como lo hicieron los extractos crudos que no fueron tratados con la enzima.

7. Resultados y discusión

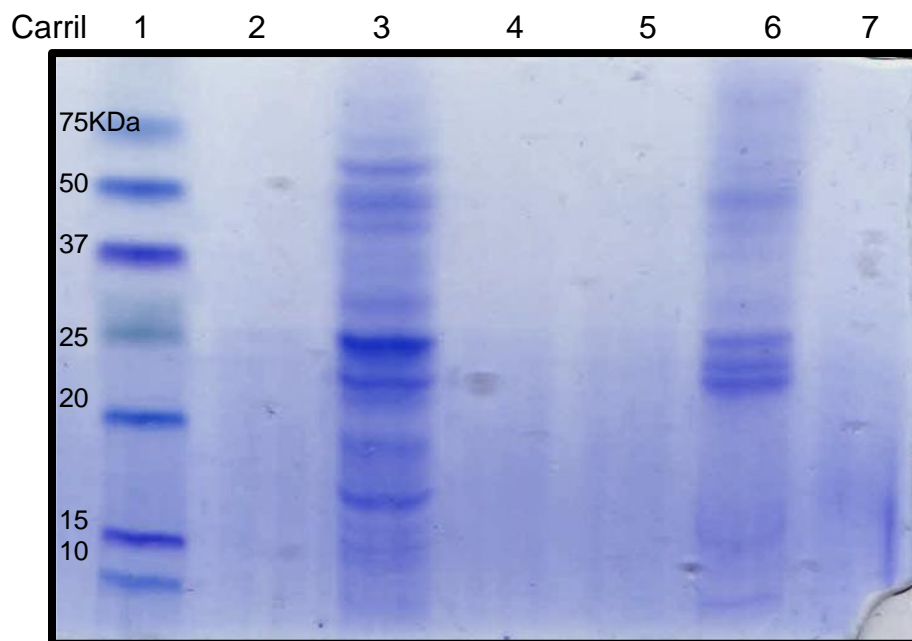


Figura 10. Gel SDS-PAGE de extractos tratados con pepsina y sin tratamiento Carriles: 1) Marcador de peso molecular, 2) libre, 3) Cepa γ -1 sin tratamiento, 4) cepa γ -1 tratado con pepsina, 5) libre 6) cepa 3980 sin tratamiento, 7) cepa 3980 tratado con pepsina.

También se corrió un gel de poliacrilamida comparando las muestras que fueron tratadas con pepsina y las que no habían sufrido un tratamiento (Figura 10). Se puede observar en los carriles 3 y 6 la presencia de proteínas pertenecientes a las cepas γ -1 y 3980 respectivamente. En los carriles 4 y 7 se colocaron las muestras que fueron tratadas con pepsina, en esos carriles no se aprecia ninguna banda de las que originalmente se encontraban en el extracto, esto indica que los péptidos fueron degradados por acción de la pepsina y que la naturaleza química del agente antimicrobiano es polipeptídica.

7. Resultados y discusión

7.9 Prueba de inhibición sobre la microbiota presente en un alimento

Se utilizó azul de metileno para determinar cualitativamente mediante su reducción, la calidad de una muestra de leche bronca y se utilizaron los sobrenadantes para ver si tenían algún efecto sobre la microbiota de la matriz alimenticia utilizada (leche bronca), disminuyéndola y elevando la calidad de la misma.

Para esta determinación se utilizaron los extractos crudos de las cepas 4, 91g, 3980, 30, ya1 y 8D (Figura 11) ya que estas fueron las cepas que mejor inhibición produjeron sobre las cepas tipo en las distintas pruebas. En un tubo de ensayo se colocó leche bronca y se le adicionó un volumen del extracto (500 μ L). Se dejó incubando a 37°C y se vigiló el cambio en la coloración.



Figura 11. Determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana de los péptidos antimicrobianos sobre microorganismos presentes en leche bronca a distintos tiempos. A: 0 minutos B: 20 minutos C: 60 minutos D: 80 minutos E: 120 minutos F: 150 minutos G: 180 minutos H: 220 minutos

Se pudo observar que en las muestras de leche a las que se les adicionó el extracto crudo perdieron la tonalidad azul a mayor tiempo (240 minutos) mientras que en la muestra de leche bronca a la que no se le adicionó extracto crudo la reducción del azul de metileno fue más rápida (110 minutos).

7. Resultados y discusión

Esto indica que los diferentes extractos probados en la leche bronca están actuando como bacteriostático sobre las bacterias que se encuentran presentes en la leche, retardando su crecimiento. De los extractos utilizados, fue el de la cepa 4 el que más retardó la pérdida de color azul de la leche (240 minutos). Con estos tiempos, podemos decir que la calidad de la leche era mala ya que el azul de metileno viró antes de las dos horas (110 minutos) mientras que la que fue tratada con el extracto de la cepa 4 tardó cuatro horas en cambiar el color del azul de metileno. Esto elevó la calidad de la leche de mala a regular.

7.10 Determinación de UFC después de emplear los extractos crudos con actividad antimicrobiana

Se realizó una determinación cuantitativa para corroborar una diferencia en la carga microbiana presente en la leche entre la muestra a la que se lo colocó bacteriocina y la que no la tenía. Para esto se realizó la técnica de dilución y vertido en placa y conteo de las UFC.

Tabla 10. Cuenta en placa de la prueba de inhibición de leche bronca.

Dilución	Número de colonias						
	Control	cepa 4	Cepa 30	Cepa ya1	Cepa 91g	Cepa 3980	Cepa 8D
10^{-1}	3722	2634	2866	2755	2816	2717	2911
10^{-2}	416	343	402	387	391	418	358
10^{-3}	246	66	143	82	97	116	106
10^{-4}	61	11	63	19	25	32	27
10^{-5}	19	2	16	2	3	7	5
Resultado estimado de UFC/mL	25×10^4	66×10^3	14×10^4	82×10^3	97×10^3	11×10^4	11×10^4

7. Resultados y discusión

Los datos obtenidos en la cuenta en placa no son concluyentes ya que solo son una estimación del número de UFC, ya que al no reducirse las colonias como debería en cada dilución (reducir un ciclo logarítmico en cada dilución) no se puede asegurar que ese sea el valor real. Con esta estimación se puede decir que en general todas las muestras que contenían algún extracto crudo redujeron la cantidad de las UFC presentes en la leche, teniendo un efecto bacteriostático sobre los microorganismos presentes.

En este caso la que fue inoculada con el extracto crudo proveniente de la cepa 4 fue la que mostró una mayor reducción en las UFC. Coincidentemente, este extracto fue el que logró una mejor inhibición en todas las pruebas y el que más retrasó la pérdida de color en la leche. El control de leche bronca presenta un valor estimado de 25×10^4 UFC/mL, mientras que la leche bronca inoculada con el extracto proteico tiene un valor estimado de 66×10^3 UFC/mL.

El extracto de la cepa ya1 fue el segundo mejor en detener el crecimiento de las bacterias presentes en la leche bronca presentando un valor estimado de 82×10^3 UFC/mL.

Después fueron los extractos crudos de las cepas 91g, 3980 y 8D los que tuvieron un efecto inhibitorio que aunque no fue muy significativo, aparentemente.

Es evidente que con esto se puede proponer la utilización de estos extractos proteicos como conservador en la industria alimentaria, aunque se deben realizar más estudios para lograr su estandarización.

8. Conclusiones

- ✓ La metodología empleada al ya estar bien estudiada y estandarizada permitió aislar y purificar distintas cepas de mixobacteria a partir de la formación de cuerpos fructíferos provenientes de diferentes muestras ambientales.

- ✓ Se pudo demostrar la producción de sustancias antimicrobianas en 11 de las cepas trabajadas, de las cuales 10 eran de las cepas aisladas previamente en el laboratorio y 1 de las cepas recién aisladas para el presente trabajo.

- ✓ Se determinó que hay actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las cepas H2, 30, 8D, 91g, JS, 3980, 4, 92F, γa-1. MX y CU sobre cepas tipo inhibiendo su crecimiento (*Escherichia coli* ATCC 53868, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028).

- ✓ Se determinó que en los extractos crudos existen proteínas y que probablemente estas sean las causantes de dicha inhibición, esto se demostró utilizando una degradación con pepsina.

- ✓ Se logró obtener extractos semi-purificados para determinar la actividad de las diferentes fracciones sobre las diferentes cepas tipo, siendo las fracciones de 10KDa las que inhibieron el crecimiento de las cepas.

8. Conclusiones

- ✓ Además las fracciones de los extractos crudos lograron la inhibición en el crecimiento de *Klebsiella oxytoca* (bacteria multirresistente) proveniente del microbioma oral humano.
- ✓ Se demostró que los diferentes extractos crudos con los posibles péptidos antimicrobianos lograron retrasar el efecto de reducción de los colorantes de 1 hora 50 minutos a 4 horas, elevando la calidad de la leche bronca de mala a regular.
- ✓ La cuenta en placa no fue concluyente, y sólo se obtuvieron valores estimados. Con estas estimaciones se puede observar que, aparentemente, las UFC disminuyen cuando la muestra de leche fue adicionada con los extractos crudos de las diferentes cepas.

9. Perspectivas

- ✓ Debido a que las mixobacterias producen distintos péptidos antimicrobianos se recomienda que se realice un zimograma, esto con la finalidad de descartar a la proteína responsable de la actividad antimicrobiana.
- ✓ Se deben realizar estudios para determinar si las mixobacterias son completamente inocuas para los seres humanos y que su uso en la industria alimentaria no afectará de ninguna manera los productos finales.

10.Referencias

- 1) Agudelo Londoño, N.; Torres-Taborda, M.; Álvarez-López, C.; Vélez-Acosta, L. 2015 **Bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas y su aplicación en la industria de alimentos**. Revista de la Asociación colombiana de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 23:186-205.
- 2) Anson, M.L. 1938. **The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin**. The Journal of General Physiology. 79-89
- 3) Barboza- Corona, J. E.; Vázquez- Acosta, H.; Salcedo Hernández, R.; Bautista-Justo, M. **Probióticos y conservadores naturales en alimentos**. Acta Universitaria, vol. 14, núm. 3, septiembre-diciembre, 2004, pp. 32-38
- 4) Beristain-Bauza, S. C.; Palou, A. y López-Malo, A. 2012 **Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en alimentos**. Temas selectos de ingeniería de alimentos. Universidad de las Américas Puebla. 64-78
- 5) Bernal, R., Guzman, M. 1984. **El antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer**. Revista Biomédica. 4: 112-121
- 6) Beshkova, D.; Frengova, G. 2012 **Bacteriocins from lactic acid bacteria: microorganisms of potential biotechnological importance for the dairy industry**. Engineering in Life Sciences. 12:1-14
- 7) Beuchat, L.R. y Golden, D.A. 1989. **Antimicrobials occurring naturally in foods**. Food Technol. 43(1): 134-142.
- 8) Blanchard J., 2000. **Los antimicrobianos naturales refuerzan la seguridad en los alimentos**. Disponible en: <http://www.directopaladar.com/2006/10/28-los-antimicrobianos-naturales-refuerzan-la-seguridad-en-los-alimentos> [último acceso: 25 de Noviembre de 2016]
- 9) Camacho, A., M.Giles, A.Ortegón, M.Palao, B.Serrano y O.Velázquez. 2009. **Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos**. 2ª ed. Facultad de Química, UNAM. México.
- 10) Campos JA. 2002. **Cultivos Probióticos y Protectores, Propiedades Funcionales (Nutraceuticas) de Valor Agregado en los Derivados Lácteos**. Lácteos y Cárnicos Mexicanos. Jun/Jul 26-37.
- 11) Carrillo Inungaray, M.; Reyes Munguía, A. 2013 **Vida útil de los alimentos**. Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias. 2(3)
- 12) Castañeda-Casimiro, J.; Ortega Roque, J. A.; Venegas-Medina, A.; Aquino-Andrade, A.; Serafín-López, J.; Estrada-Parra, S.; Estrada, I. 2009 **Péptidos antimicrobianos: péptidos con múltiples funciones**. Pediátricas 18(1):16-29.

10.Referencias

- 13)Chen, H. y Hoover, D.G. 2003. **Bacteriocins and their food applications**. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Technology 2: 82-9
- 14)Chertorivski, S. 2012. **ACUERDO por el que se determinan los aditivos y coadyuvantes en alimentos, bebidas y suplementos alimenticios, su uso y disposiciones sanitarias. Diario Oficial. Ley general de salud**. [En línea] (Actualizado el 16 de diciembre de 2016) Disponible en http://www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/Acuerdo_aditivos_160712.pdf [Último acceso 03 de febrero de 2017]
- 15)Cleeveland, J.; Mantiville, T. J.; Ness, I. F. and Chiknids, M. L. (2001), **Bacteriocins: safe antimicrobials for food preservation**. International Journal of Food Microbiology, 71,1-20.
- 16)Cotter, P.; Hill, C.; Ross, P. 2005. **Bacteriocins: Developing innate immunity for food**. Nature Reviews Microbiology. 3:777-788
- 17)Cristóbal, R.L. 2008. **Lactobacilos productores de bacteriocinas aislados de quesos artesanales provenientes de Lima y provincias** [Tesis MSc]. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 42 p. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/handle/cybertesis/235> [Último Acceso 16 de Enero de 2017]
- 18)Dawid, W. 2000. **Biology and global distribution of mixobacteria in soils**. FEMS Microbiology Reviews. 24:403-427
- 19)Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. y Ross, P. 2006. **Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension**. International Dairy Journal 16: 1058-1071.
- 20)Ekbal, M.; Ibrahim, A.; y Elbarbary, H.A. 2012 **Effect of bacteriocin extracted from Lactobacillus acidophilus on the shelf-life of pasteurized milk**. Journal of American Science. 8:620-626
- 21)Errecalde, J. 2004. **Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencia del desarrollo de resistencias en la salud pública**. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, FAO. 162.
- 22)Evangelista-Martínez, Z.; Moreno-Enríquez, A. 2007. **Metabolitos secundarios de importancia farmacéutica producidos por actinomicetos**. BioTecnología. 11(3):37-50

10.Referencias

- 23)FAO y OMS. 2006. **Probióticos en los alimentos Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación.** Estudio FAO alimentación y nutrición. 85.
- 24)García-Jiménez, J.L.; Palanca-Aldaní, M.; Berglíter-García D.; Hernández-De Lujan, S. 2008. **Aditivos alimentarios: Los grandes desconocidos.** Disponible en: http://www.mercasa.es/files/multimedios/pag_080-086_aditivos.pdf [Último acceso 23 de Febrero de 2017]
- 25)Grande , M.; Lucas , R.; Abriouel , H.; Ben -Omar , N.; Maqueda , M.; Martínez -Bueno , M.; Martínez - Cañamero, M.; Valdivia , E.; Galvez , A., 2005 **Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48.** International Journal of Food Microbiology, 104:289-297.
- 26)González- Martínez, B., Gómez-Treviño, M.2003. **Bacteriocinas de probióticos.** RESPYN, Revista salud pública y Nutrición. Vol 4:No.2
- 27)Gutiérrez, P.; Orduz, S. 2003. **Péptidos antimicrobianos: Estructura, función y aplicaciones.** Actual Biol 78:5-15
- 28)Informes EUFIC 06/2008 Los aditivos alimentarios. Disponible en: <http://redmidia.com/notas/3030/aditivos-alimentarios> [Último acceso 23 de Febrero de 2017]
- 29)Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. 1995. **Bacteriocins of Gram positive bacteria.** Microbiol. Rev. 59: 171-200.
- 30)Jiménez-López, C.; Jroundi, F.; Rodriguez-Gallego, M.; Arias, J. M.; Gonzalez-Muñoz, M.T. 2007. **Biomining induced by Myxobacteria.** Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. 143-154
- 31)Juliarena, P.; Gratton, R. 2012. **Tecnología, ambiente y sociedad.** Editorial Unicen. Capítulo 3
- 32)Klaenhammer, T. R. 1993. **Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria.** FEMS Microbiol. Rev. 12:39-86.
- 33)Kemperman , R.; Kuipers , A.; Karsens , H.; Nauta , A.; Kuipers , O.; Kok , J. 2003. **Identification and characterization of two novel clostridial bacteriocins, circularin A and closticin 574.** Applied Environmental Microbiology, 69:1589-1597.
- 34)Lai, A. C.; Tran , S.; Simmonds , R. S. 2002. **Functional characterization of domains found within a lytic enzyme produced by *Streptococcus equi* subsp. Zoepidemicus.** FEMS Microbiology Letters, 215: 133-138.

10.Referencias

- 35)Line, J.E., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V. y Mitsevich, I.P. 2008. **Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against Gram-positive and Gram negative bacteria.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52: 1094-1100.
- 36)López M., Joel; Ochoa Z., Alejandra; Santoyo P., Gustavo; Anaya L., José Luis; Medina M., Everardo; Martínez T., Miguel; Loeza L., Pedro Damián. 2008. **Bacteriocinas de bacterias Gram positivas: una fuente potencial de nuevos tratamientos biomédicos.** Revista Mexicana de Ciencias Farmacéutica. 39: 49-57
- 37)Madrid, A., Cenzano, I., J. M. Vicente. 2001. **Nuevo Manual de industrias alimentarias.** Ediciones Mundi prensa.
- 38)Marcos, E., Castillo, F.A., Dimitrov, S.T., Gombossy de Melo, B.D., De Souza, R.P. (2013). **Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review.** Food Control, 32: 134-142.
- 39)Martínez-López, R.; Tepal Chalé, J. A.; Hernández Andrade, L.; Escobar Ramírez, M. C.; Amaro Gutiérrez, R.; Blanco Ochoa, M. A. 2011. **Mejora continua de la calidad higiénico-sanitaria de la leche de vaca. Manual de Capacitación.** SAGARPA. Instituto Nacional de Investigaciones forestales, agrícolas y pecuarias. Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología animal.
- 40) Merck Products, fotografía tubo Amicon.
http://www.merckmillipore.com/MX/es/product/Amicon-Ultra-15-Centrifugal-Filter-Units,MM_NF-C7715?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.com.mx%2F&bd=1
- 41)Mondragon Preciado, G.; Escalante Minakata, P.; Osuna Castro, J. A.; Ibarra Junquera, V.; Morlett Chávez, J. A.; Aguilar Gonzalez, C. N.; Rodríguez Herrera, R. 2013. **Bacteriocinas: características y aplicaciones en alimentos.** Investigación y Ciencia 59:64-70
- 42)Monroy Dosta, M.; Castro Barrera, T.; Fernández Perrino, F.; Mayorga Reyes, L. 2009. **Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticos.** ContactoS 73:63-72
- 43)Montaño Pérez, K.; Vargas Albores, F. 2002. **Péptidos antimicrobianos: un mecanismo de defensa ancestral con mucho futuro.** Interciencia. 27(1):21-27

10.Referencias

- 44) Morales, D., Gallo, L., Instituto de Biotecnología. 2006 “**Métodos Físico-químicos en biotecnología**” **Plataformas de proteómica**. [En línea] (Actualizado al 24 de octubre de 2016) Disponible en: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/plataformas_de_proteomica.pdf [Último acceso el 28 de diciembre de 2016]
- 45) Mulet-Powell, N.; Lacoste-Armynot, A. M.; Viñas, M.; Simeon de Buochberg, M. 1998. **Interactions between in pairs of bacteriocins from lactic bacteria**. Journal of food protection. 61:1210-1212
- 46) Naidu, A.S.; Unal, R. y Tulpinski, J. 2006 **Bacteriocins: antimicrobial activity and applications**. En: Shetty, K.; Paliyath, G.; Pometto, A. y Levin, R. E. Food Biotechnology. Segunda edición, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 1291-1437
- 47) Nychas, G.J.E. 1995. **Natural Antimicrobials from plants**. En: New Methods of food preservation. G.W. Gould (Ed.). Blakie Academia y Professional. Glasgow. p. 1-21. Citado en: Welti-Chanes, J., Vergara-Balderas, F., y López-Malo, A. 1997. **Minimally Processed foods state of the Art and Future**. En: P. Fito., E. Ortega-Rodríguez y G. Barbosa-Canovas (Eds.). Food Engineering 2000. E.U.A. Chapman y Hall. pp. 181-212.
- 48) Olvera-García, M.; Serrano-Maldonado, C. E.; Quirasco, M. 2015. **Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas**.
- 49) Peterson, G. L. 1977. **A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Which is more generally applicable**. Analytical Biochemistry 83:346-356.
- 50) Reichenbach H. y Höfle, G. 1993. **Biologically active secondary metabolites from myxobacteria**. Biotechnol Adv. 11(2):219-77.
- 51) Reichenbach, H. 2001. **Myxobacteria, producers of novel bioactive substances**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 27:149-156.
- 52) Rodríguez-Sauceda, E. 2011. **Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas**. Ra Ximhai. 7(1) 153-170
- 53) Saenz Peña, Chaco. 2007 **Antibióticos y Antimicrobianos**. Fac. de Agroindustrias Área de Investigación y Desarrollo. Agroveter Market Animal Health

10.Referencias

- 54)Schägger H.; Von Jagow, G.1987. **Tricine- sodium Dodcylsulfate-polyacrylamide Gel Electrophoresis for the separation of proteins in the Range from 1 a 100 kDa.** Analytical Biochemistry. 166:368-379.
- 55)Shimkets, L.; Dworkin, M.; Reichenbach, H. 2006. **The Myxobacteria.** Prokaryotes 7:31-115
- 56)Stiles ME. 1996. **Biopreservation by lactic acid bacteria.** Antonie van Leeuwenhock. 70:331-345.
- 57)Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C. (2009). **Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of Listeria monocytogenes in cold-smoked wild salmon.** Food Microbiology, 26(8): 783-793.
- 58)Téllez, Germán A.; Castaño, Jhon C. 2010. **Péptidos antimicrobianos.** Asociación Colombiana de Infectología. Revista INFECTIO; 14(1):55-67
- 59)Tonarelli, G.; Simonetta, A. 2013. **Revisión: Péptidos antimicrobianos de organismos procariotas y eucariotas como agentes terapéuticos y conservantes de alimentos.** Revista FABICIB; 17:137-177
- 60)Universidad de Zulia. 2003 **Guía práctica. Introducción al control de calidad de la leche bronca.** [En línea] (Actualizado al 24 mayo de 2017) Disponible en: http://depa.fguim.unam.mx/amyd/archivero/materialdeapoyoparapruebasdeplat aforma_1693.pdf [Último acceso el 24 de mayo de 2017]
- 61)Valencia García, F.; Millán Cardona, L.; Jaramillo Garcés, Y. 2008. **Estimación de la vida útil fisicoquímica, sensorial e instrumental de queso crema bajo en calorías.** Revista Lasallista de Investigación. 5(1):28-33
- 62)Vásquez, S.M., Suárez, H., Zapata, B.S. (2009). **Utilización de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas en la conservación de la carne.** Revista Chilena de Nutrición, 36(1): 64-71.
- 63)Villada M., José Juan. 2010. **Conservadores químicos usados en la industria alimentaria.** Depto. De Ciencia y tecnología alimentaria. Universidad Autónoma Agraria. Saltillo, México.

11. Anexos

- **Elaboración de placas de Sílica gel**

Para la elaboración de la sílica gel se preparan las siguientes soluciones:

Tabla 11. Soluciones para preparar la sílica gel

Solución A		Solución B	
HCl concentrado	61 mL	Silicato de Sodio	18 mL
H₂O destilada	39 mL	H ₂ O destilada	82 mL

Se vierte la mezcla B en la A (Volúmenes iguales). Una vez solidificadas se lavan con agua destilada por 3 días cambiando el agua cada día cuando el pH de las cajas es de 5 se coloca un círculo de papel filtro Whatman del número 1 y se agrega 1 mL de CaCO₃ al 2% para llevar a pH 7.

- **Medio CY**

Tabla 12. Proporciones para preparación de medio CY

Ingrediente	Porcentaje
Peptona de caseína	0.3
Extracto de levadura	0.1
CaCl₂ 2H₂O	0.1
Agar	1.5

Para la elaboración de caldo solo se omite la adición de agar. Para preparar este medio se utiliza un medio mineral previamente preparado y no agua destilada.

- **Medio Mineral**

Primero se preparan todas las soluciones necesarias, cada una se guarda en un frasco ámbar etiquetado.

Tabla 13. Proporciones para preparar ingredientes del medio mineral

Ingrediente	g/ 100 mL	Ingrediente	g/100 mL
NH₄SO₄	20	*H ₃ BO ₃	2.86
K₂HPO₄	3.9	*MnCl ₂ 4H ₂ O	0.181
MgSO₄ 7H₂O	7.5	*ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.222
NaCO₃	2	*NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.191
EDTA	0.1	*CuSO ₄ 5H ₂ O	0.079
Citrato de sodio	0.6	*Co(NO ₃) ₂ H ₂ O	0.0494
**FeSO₄	0.3		

11. Anexos

*Se toma 1 mL de cada una de estas soluciones y se lleva a un volumen final de 100 mL, se guarda en un frasco etiquetado como "Micronutrientes".

** Se esteriliza por medio de filtración con membrana de 0.22 μ m ya que con el calor precipita.

Todos los frascos se esterilizan en autoclave.

En un frasco estéril, colocar las siguientes cantidades de cada stock en zona aséptica

Para 1L de medio mineral

Tabla 14. Proporciones para preparar medio mineral

Ingrediente	mL
NH₄SO₄	10
K₂HPO₄	1
MgSO₄ 7H₂O	1
NaCO₃	1
EDTA	1
Citrato de sodio	1
FeSO₄	1
Micronutrientes	1
Agua destilada	983

- **Curva patrón para cuantificación de proteína**

La cuantificación se realizó por el método de Lowry (Peterson, 1977).

Primero se preparan los reactivos a utilizar, estos deben prepararse en el momento ya que de lo contrario estos se oxidan y no servirán en la cuantificación de la muestra.

11. Anexos

La solución A: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

La solución B: CuSO_4 al 1%

La solución C: Tartrato doble de sodio y potasio al 2% en NaOH 0.1N

Se mezclan en proporciones A 100: B 1: C 1 y se agita para homogenizar.

Por otro lado se realiza una dilución del reactivo de Folin con agua (1:1)

Para la curva patrón se utiliza un stock de Albúmina Sérica Bovina (ABS) de 1 mg/mL y se coloca un volumen de muestra y reactivos de la siguiente manera:

Tabla 15. Valores de referencia para elaboración de curva patrón.

Tubo	Vol del stock μL	Agua μl	Reactivos Mezcla (A:B:C)	Reactivo de Folin	Abs. a 660 nm
Blanco	0	100	800	100	
1	5	95	800	100	0.130
2	10	90	800	100	0.309
3	15	85	800	100	0.455
4	20	80	800	100	0.548
5	25	75	800	100	0.710
6	30	70	800	100	0.834
7	35	65	800	100	0.890
8	40	60	800	100	1.017
9	45	55	800	100	1.090
10	50	50	800	100	1.143

11. Anexos

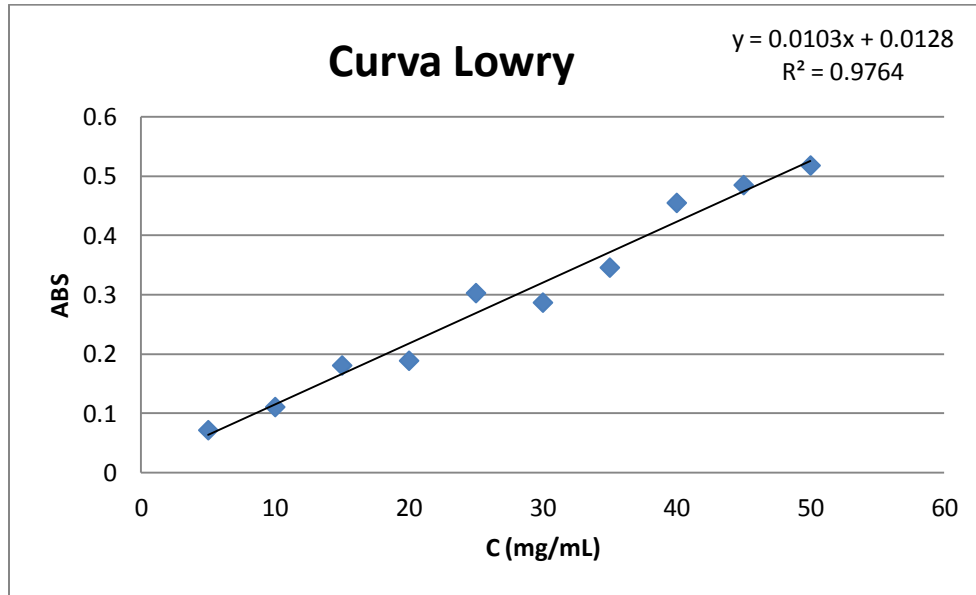
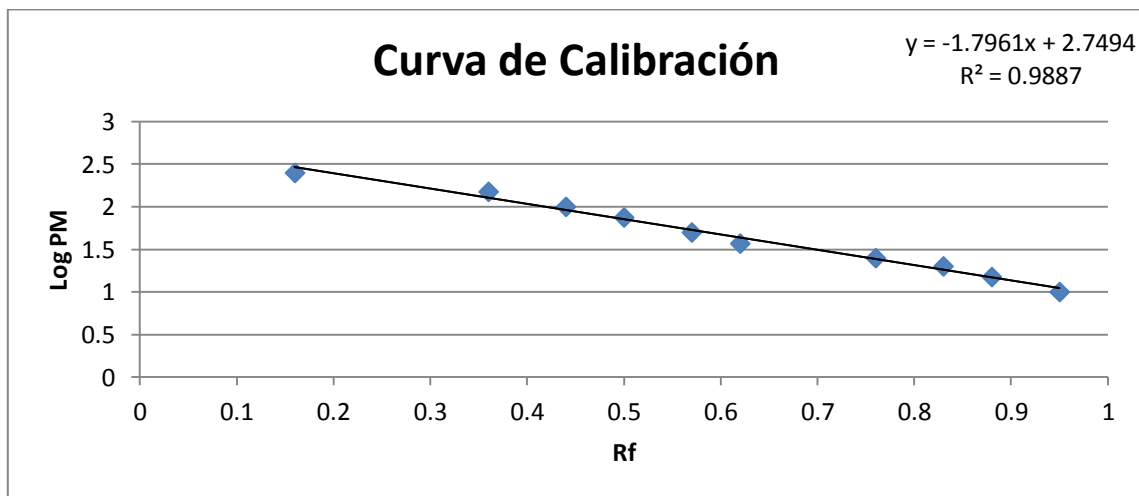


Gráfico 2. Curva patrón de proteína

- **Curva de calibración para determinar el peso molecular de las bandas**

Se calculó el peso molecular de las bandas obtenidas, para esto se realizó una curva de calibración:



Gráfica 3. Curva de calibración para determinar el peso molecular de las bandas en el gel.

11. Anexos

De esta curva se utilizó la fórmula

$$y = -1.7961x + 2.7494$$

Donde x es el Rf de la muestra:

$$Rf = \frac{\text{Distancia recorrida de la proteína (mm)}}{\text{Distancia total recorrida (mm)}}$$

El tamaño de las proteínas se calculó solo para las bandas que están en los recuadros en la Figura 8. Ya que son las bandas más intensas en el gel lo que indica que están en mayor proporción en el sobrenadante y las que posiblemente participen en la inhibición de las cepas.

Tabla 16. Peso molecular de bandas presentadas por los concentrados en gel de poliacrilamida

Sobrenadante	PM
γa1(1)	21.26
γa1(2)	15.16
4	15.37
3980	15.59

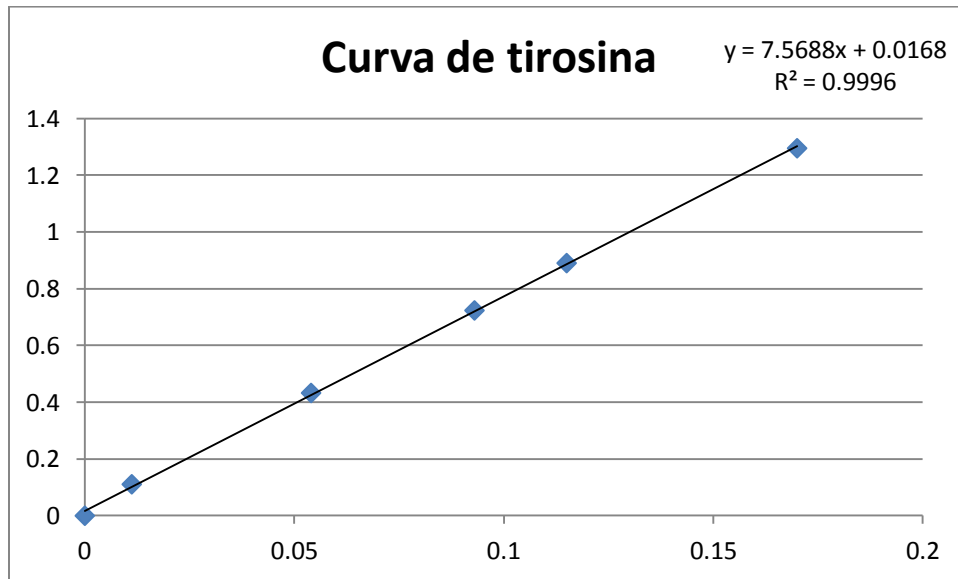
Estos tamaños son coherentes si tomamos en cuenta que las muestras son las correspondientes al filtro de 10KDa, el cual retiene a proteínas mayores.

11. Anexos

- **Curva de tirosina (Técnica de Anson modificada) (Anson, 1938).**

Tabla 17. Valores de referencia para elaboración de curva patrón

#	Vol stock Tyr	Vol NaOH	Abs	[Tyr] $\mu\text{mol/mL}$
0	0	2.5	0	0
1	0.5	2	0.111	0.0112
2	1	1.5	0.433	0.054
3	1.5	1	0.724	0.093
4	2	0.5	0.891	0.115
5	2.5	0	1.296	0.17



Gráfica 4. Curva patrón de tirosina