



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

Caracterización y purificación de sustancias
antimicrobianas producidas por una cepa de
Streptococcus spp. aislada del pozol

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA

GABRIELA MELLADO TORRES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX., 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: GLORIA DÍAZ RUIZ
VOCAL: FRANCISCO RUIZ TERÁN
SECRETARIO: ALEIDA MINA CETINA
1ER. SUPLENTE: ELSI IDELI JUÁREZ ARROYO
2° SUPLENTE: MARÍA DEL CARMEN WACHER RODARTE

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA

Dra. Gloria Díaz Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO

Dra. María del Carmen Wacher Rodarte

SUSTENTANTE

Gabriela Mellado Torres

RECONOCIMIENTO

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

Índice

Introducción	1
Antecedentes	2
Alimentos fermentados	2
Pozol	4
Bacterias ácido lácticas	6
Metabolismo.....	6
Compuestos antimicrobianos generados por las BAL.....	8
<i>Streptococcus</i> spp.	8
Bacteriocinas	9
Clasificación.....	11
Biosíntesis.....	12
Mecanismo de acción.....	14
Aplicación en la industria de alimentos.....	16
Peptidoglucano hidrolasas	18
<i>Listeria monocytogenes</i>	20
Listeriosis.....	21
Justificación	23
Hipótesis	23
Objetivos	24
Objetivo General	24
Objetivos Particulares	24
Metodología	25
Microorganismos utilizados	26
BAL.....	26
Microorganismos indicadores. Ensayo de actividad antimicrobiana.....	26
Reactivación de cepas	26
Conservación de cepas	26
Obtención de sobrenadante de la cepa A45212	27

Pruebas de difusión agar	27
Precipitación de proteínas con sulfato de amonio.....	29
Diálisis	29
Adsorción y desorción.....	31
Cuantificación de proteína por el método de Bradford.....	34
Precipitación con TCA.....	34
Preparación de muestras para carga de electroforesis SDS-PAGE	34
Electroforesis (SDS-PAGE) y zimograma.....	34
Resultados y discusión	38
Conclusiones	56
Perspectivas	57
ANEXOS	58
Referencias	64

Introducción

La conservación de alimentos por fermentación es una tecnología antigua y ampliamente practicada. La fermentación asegura no solo una mayor vida útil y la seguridad microbiológica de un alimento, sino que también puede hacer que algunos alimentos sean más digeribles (Caplice y Fitzgerald, 1999).

Entre los alimentos fermentados de origen mexicano, se encuentra el pozol, una bebida ácida, refrescante, no alcohólica, que se obtiene de la fermentación natural de la masa de maíz nixtamalizado (Ulloa y col., 1983; Wacher, 2014). Entre las bacterias que forman la microbiota del pozol, destacan las bacterias del ácido láctico (BAL) y representan más del 90% de la microbiota activa del pozol (Ampe y col., 1999; Wacher y col., 2000).

Las BAL debido a sus características metabólicas únicas están involucradas en muchos procesos de fermentación (Caplice y Fitzgerald, 1999). Estos microorganismos pueden producir una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios antagónicos que incluyen una amplia gama de bacteriocinas, algunas de las cuales tienen actividad contra patógenos de origen en alimentos como *Listeria monocytogenes* y *Clostridium botulinum* (Ross y col., 2002). La conservación de alimentos, así como la prevención de enfermedades causadas por estos es un tema que ha motivado la investigación científica. El empleo de aditivos de origen natural es uno de los campos más ampliamente estudiados (Lugo, 2013).

Las bacteriocinas de las BAL son un grupo diverso de proteínas/péptidos antimicrobianos, que ofrecen un potencial como conservadores y exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana a bajas concentraciones (Kumari y col., 2014). En los últimos años se han descubierto y caracterizado nuevas bacteriocinas de BAL, que permiten aprovechar al máximo su potencial antimicrobiano (Lugo, 2013).

En un trabajo previo (Maldonado, 2016), se comprobó, mediante pruebas de difusión en agar, que la cepa de *Streptococcus* spp. A45212 aislada del pozol, produce una proteína parecida a una bacteriocina que inhibe el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Antecedentes

Alimentos fermentados

Al principio de su historia, el hombre fue nómada, para después establecerse en algún lugar determinado y volverse sedentario, derivado de esto, surgió la necesidad de almacenar los excedentes de alimentos, es decir, de conservarlos. Surgió la posibilidad de cocinarlos o prepararlos de formas variadas. Dentro de estas formas quizás la más sencilla fue el secado al sol y la más compleja la fermentación. La fermentación es un proceso más complejo, ya que la transformación del alimento (el cereal, la fruta o, eventualmente, la leche) se produce por acción de microorganismos del medio ambiente, los cuales, al utilizar los componentes disponibles del alimento, pueden reproducirse transformando el sabor, el color, el olor, la textura e incluso el valor nutricional del producto en el que están creciendo y fermentando (Wacher, 2014).

No fue sino hasta el siglo XVIII que Antonie van Leewenhoek desarrolló los lentes que más tarde dieron lugar al microscopio, instrumento que permitió a los seres humanos adentrarse en el mundo invisible que nos rodea, mundo en el que los microorganismos son los habitantes centrales. Un siglo después, Pasteur relacionó los microorganismos con la descomposición y con la fermentación, y Koch, con las enfermedades. Aunque de todo esto hace menos de dos siglos, es sólo durante las últimas décadas que se ha puesto en evidencia que la gran mayoría de los alimentos fermentados cuentan con una serie de propiedades fundamentales para una dieta variada y equilibrada, quizás una de las razones por las cuales su preparación y consumo se ha mantenido hasta nuestros días (Wacher, 2014).

La fermentación es un proceso utilizado para conservar y mejorar la calidad de los alimentos (Sivamaruthi y col., 2018). Los alimentos fermentados son definidos como sustratos alimenticios que son procesados por microorganismos comestibles (bacterias, levaduras y mohos) cuyas enzimas hidrolizan los polisacáridos, proteínas y lípidos a productos no tóxicos con sabores, aromas y texturas deseables para el ser humano (Montet y Ray, 2015).

Los alimentos fermentados tradicionales, son fermentados por la microbiota inicial del sustrato, están arraigados a la cultura de las regiones en las que fueron desarrollados o adaptados; algunos alimentos se han beneficiado de los avances científicos y tecnológicos, como la cerveza, el vino o la producción de yogurt; y en otros, el proceso se mantiene con muy poca innovación: tal es el caso del pozol o del pulque en México (Wacher, 2014; Kolawole y col. 2007).

Los alimentos fermentados tradicionales no sólo son alimentos básicos para la mayoría de los países en desarrollo, sino también alimentos saludables importantes para los países desarrollados (Montnet y Ray, 2015).

Hoy en día, la fermentación microbiana es la forma más simple y económica de mejorar la calidad nutricional de los alimentos (Somvanshi y col., 2017). Es común que los microorganismos de un alimento fermentado constituyan una microbiota compleja, constituida por una gran cantidad y diversidad de microorganismos. En los productos fermentados modernos se ha logrado determinar aquel o aquellos microorganismos clave para el proceso fermentativo (Wacher, 2014). A medida que las funciones de salud de estos alimentos se descubren, se utilizan biotecnologías de mayor rendimiento para promover las industrias de alimentos fermentados. Se investigan ampliamente los microorganismos, la bioquímica del proceso, la fabricación y el procesamiento posterior, así como los metabolitos bioactivos liberados por los organismos en fermentación y, sobre todo, las funciones de salud de estos alimentos. Además, las aplicaciones y el progreso de la bioquímica y la biotecnología aplicadas a los sistemas alimentarios tradicionales fermentados son diferentes unos de otros, ya que los microorganismos y las matrices de alimentos varían ampliamente (Montet y Ray, 2015).

No es sino hasta hace unas cuantas décadas que se analiza con profundidad a los microorganismos responsables de alimentos fermentados prehispánicos, los cuales además de presentar actividades fisiológicas interesantes, podrían usarse como cultivos iniciadores para producir estos alimentos en condiciones controladas. Es un reto importante para la biotecnología moderna nacional aprovechar los procesos y el conocimiento derivado de los alimentos que se originaron en el pasado (alimentos prehispánicos) para mejorar los que se producen en la actualidad (Wacher, 2014).

Pozol

Entre las bebidas y los alimentos fermentados autóctonos de México se encuentra el pozol, bebida de maíz de origen maya que forma parte de la alimentación básica de muchos grupos étnicos del sur y el sureste de México: chontales, choles, mayas, lacandones, tzotziles o chamulas, tzetzales, zoques y zapotecos.

El nombre pozol es de origen náhuatl, *pozolli*, que quiere decir espumoso. Se prepara con bolas de masa de maíz nixtamalizado (ya sea blanco, amarillo o negro) envueltas en hojas del árbol de plátano, que se dejan fermentar por tiempos que varían considerablemente, ya que en algunos casos sólo se fermenta por unas horas, mientras que en otros el tiempo de fermentación es de varios días (3 a 7 días), pero puede incluso llegar a ser de hasta un mes. Las bolas de maíz fermentado se consumen disueltas en agua durante la comida, el trabajo o a cualquier hora del día como una bebida refrescante. También tiene usos medicinales, rituales y, debido a su alto grado de conservación, las bolas de pozol son utilizadas como provisiones en travesías largas. Los lacandones utilizan el pozol mezclado con miel para bajar la fiebre y controlar la diarrea (Wacher, 2014).

La microbiota del pozol está constituida por bacterias, mohos y levaduras. Entre las bacterias que habitan el pozol, destacan las bacterias del ácido láctico (BAL), bacterias mesófilas aeróbicas no lácticas y las enterobacterias (Ampe y col., 1999; Wacher y col., 2000).

Las BAL representan más del 90% de la microbiota activa del pozol (Ampe y col., 1999; Wachter y col., 2000), son las primeras en desarrollarse y están presentes durante todo el proceso. Éstas son las responsables de la acidificación de la masa (llega a tener un valor de pH cercano a 4), ya que producen ácido láctico, que imparte un sabor fresco y agradable al producto. De ellas destacan las bacterias amilolíticas, como *Streptococcus infantarius* y *Streptococcus macedonicus* (Díaz Ruiz y col., 2003; Wachter, 2014) y no amilolíticas, como *Weissella confusa* y *Lactobacillus delbrueckii* (Ben Omar y Ampe, 2000). En la tabla 1 se pueden observar algunas de las BAL que han sido aisladas del pozol.

Tabla 1. Bacterias ácido lácticas aisladas del pozol.

Bacteria aislada	Referencia	Bacteria aislada	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Ampe y col., 1999; Ben Omar y Ampe., 2000; Escalante y col., 2001.	<i>Streptococcus infantarius</i>	Díaz Ruiz y col., 2003
<i>Enterococcus saccharolyticus</i>	Ben Omar y Ampe, 2000	<i>Streptococcus macedonicus</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Enterococcus sulfureus</i>	
<i>Weissella confusa</i>		<i>Lactococcus lactis</i>	Díaz Ruiz y col., 2003; Escalante y col., 2001
<i>Streptococcus bovis</i>	Ben Omar y Ampe, 2000; Díaz Ruiz y col., 2003	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	Escalante y col., 2001
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Ben Omar y Ampe, 2000; Escalante y col., 2001	<i>Leuconostoc mesenteoides</i>	Nuraida y col., 1995; Ben Omar y Ampe, 2000
<i>Lactobacillus casei</i>		<i>Lactobacillus pentosus</i>	Ampe y col., 1999

(Adaptada de Maldonado, 2016).

Bacterias ácido lácticas

Las BAL son cocos o bacilos Gram positivos, no esporulados, no móviles, anaerobios, microaerofílicos o aerotolerantes; oxidasa, catalasa y benzidina negativos, carecen de citocromos, no reducen el nitrato a nitrito y producen ácido láctico como el único o principal producto de la fermentación de carbohidratos (Carr y col., 2002; Vázquez y col., 2009). Son organismos nutricionalmente exigentes y son capaces de hidrolizar péptidos de la leche (Ramírez y col., 2011).

Las BAL tienen una larga historia de aplicación en los alimentos fermentados debido a su influencia benéfica sobre las características nutricionales, organolépticas y de vida útil (De Vuyst y Leroy., 2007). Los géneros más destacados de las BAL son *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Weissella*, todos pertenecientes al orden *Lactobacillales* (Holzapfel y Wood, 2014).

- **Metabolismo**

Existen diversos géneros de BAL; éstas son agrupadas como homofermentadoras o heterofermentadoras basado en el producto final de su fermentación.

Las BAL homofermentadoras como *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Vagococcus* y algunos *Lactobacillus*, poseen la enzima aldolasa y producen ácido láctico como el producto único de la fermentación de la glucosa utilizando la vía de glucólisis (Axelsson, 1998) (figura 1).

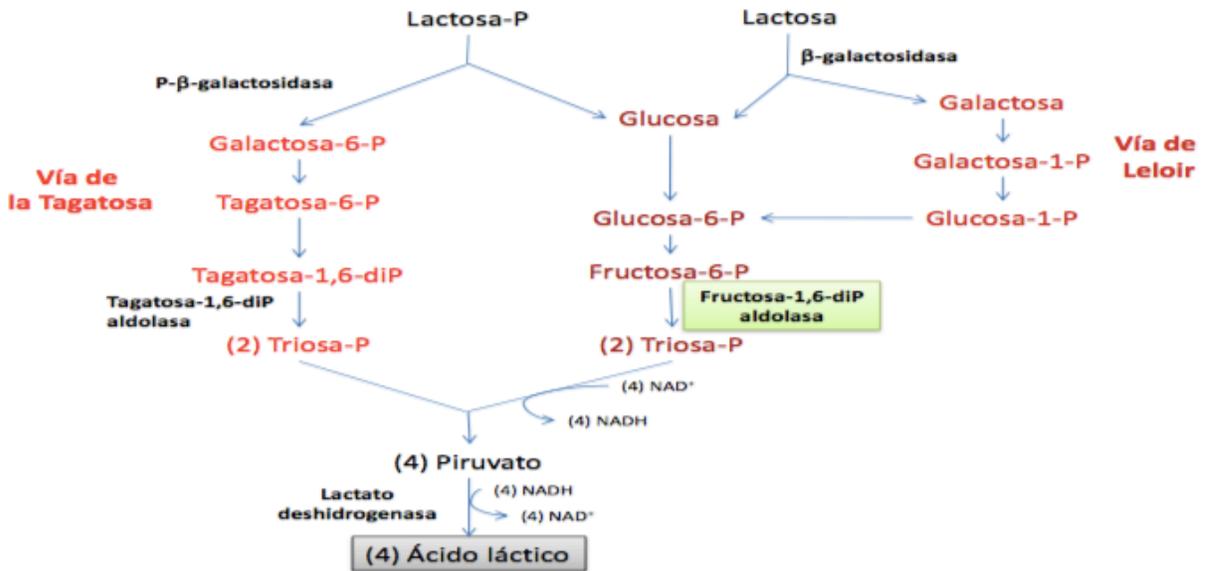


Figura 1. Metabolismo homofermentativo de las BAL (Tomado de Giles, 2012).

Por su parte, las del género *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos *Lactobacillus* son heterofermentadoras y convierten hexosas a pentosas por la vía 6-fosfogluconato- fosfocetolasa, produciendo en el proceso además de ácido láctico, cantidades significantes de otros productos como acetato, etanol y CO₂ (Carr y col., 2002) (figura 2).

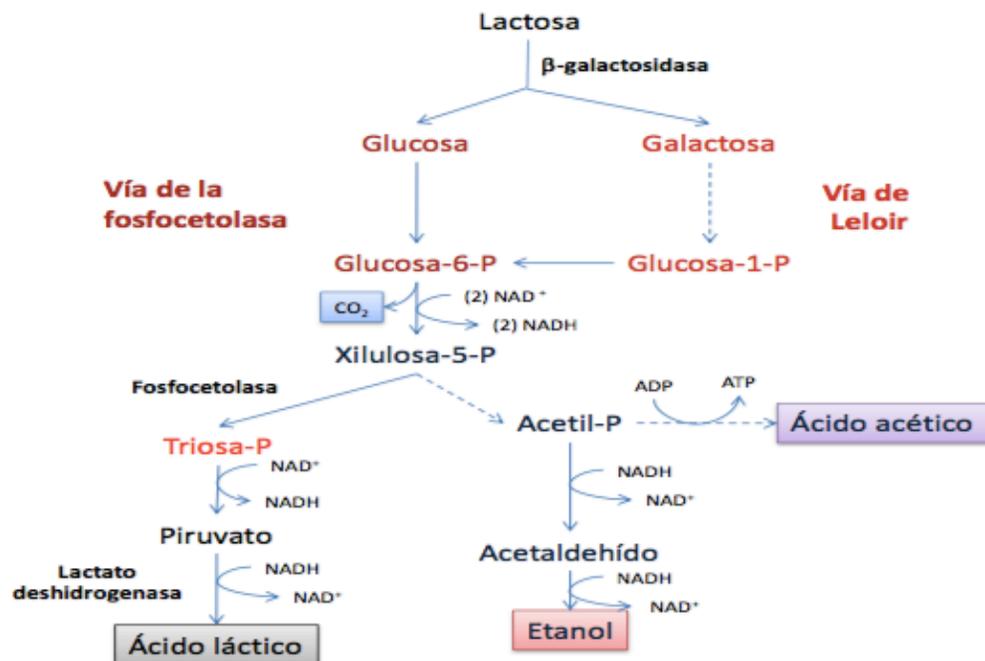


Figura 2. Metabolismo heterofermentativo de las BAL (Tomado de Giles, 2012).

- Compuestos antimicrobianos generados por las BAL

Los mecanismos antimicrobianos específicos de las BAL, explotados en la conservación de alimentos, incluyen la producción de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, diacetilo, la producción de bacteriocinas (De Vuyst y Vandamme, 1994) y enzimas que degradan la pared celular, como las peptidoglucano hidrolasas.

Los ácidos orgánicos tales como ácido láctico y acético, reducen el pH del ambiente con un efecto inhibitorio de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. En ese sentido, la forma no disociada del ácido láctico puede penetrar con mayor facilidad la pared celular microbiana donde el pH más alto del contenido celular promueve la disociación, dando lugar a la liberación de iones hidrógeno y el anión correspondiente; de modo que, ambos iones interfieren en el metabolismo e inhiben el crecimiento celular (Vázquez y col., 2009).

Cuando el oxígeno está presente, las BAL pueden producir peróxido de hidrógeno, el cual genera radicales hidroxilo- que causan peroxidación a los lípidos de la membrana y susceptibilidad de la célula microbiana de muchos microorganismos.

El dióxido de carbono es un producto final de la fermentación heteroláctica y en ocasiones se obtiene por descarboxilación de aminoácidos por BAL. El dióxido de carbono promueve un ambiente anaeróbico, reduce el pH y puede ayudar a destruir la integridad de la pared celular microbiana. Así mismo, el diacetilo es producido por BAL que fermentan el citrato y es sintetizado en el metabolismo intermediario del piruvato (Ouweland, 1998), su actividad antibacteriana es más efectiva a valores de pH menores de 7 y las cantidades necesarias para que se presente la actividad antibacteriana son muy elevadas (Magnusson, 2003; Salminen y col., 2004).

- *Streptococcus* spp.

Es una bacteria Gram positiva, que tiene dimensiones de 0.5 nm-2.0 nm. Son células esféricas u ovoides en parejas o cadenas, inmóviles, homofermentadoras, no esporuladas y su requerimiento de oxígeno es facultativo. Es una bacteria fermentadora, y produce fundamentalmente lactato (Carr y col., 2002; Prescott y col., 2004).

Dentro del género *Streptococcus*, se encuentran especies patógenas (p. ej., *S. pyogenes*) no patógenas y de importancia en alimentos (p. ej., *S. salivarius*) y otras que se han descrito como patógenos oportunistas (p. ej., algunos *S. infantarius*) (Burton y col., 2006; Stollerman y Dale, 2008; Jans y col. 2015).

Las principales especies de *Streptococcus* encontradas en el pozol son: *S. infantarius*, *S. macedonicus* y *S. bovis* (actualmente *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius*), esta última es la especie dominante entre las cepas de bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol (Díaz Ruiz y col., 2003; Becerril, 2012; Maldonado, 2016).

Se determinó su posible capacidad probiótica, pues se encontró que cepas del género *Streptococcus* aisladas del pozol de Villahermosa, Tabasco; tienen esta característica al ser evaluada su resistencia al fenol, producción de peróxido de hidrógeno, sobrevivencia a pH 2.5 a 3, resistencia a sales biliares, sensibilidad a antibióticos, así como la capacidad de adherencia a células Hep-2 (Rodríguez y Villalva, 2010).

Bacteriocinas

Como se mencionó anteriormente, los microorganismos producen un conjunto de sistemas de defensa microbiana y dentro de estos están las bacteriocinas.

Las bacteriocinas de las BAL son un grupo diverso de proteínas/péptidos antimicrobianos, que ofrecen un potencial como conservadores y exhiben un amplio espectro de actividad antimicrobiana a bajas concentraciones junto con la estabilidad térmica y de pH en los alimentos, sin ningún efecto tóxico para los seres humanos. Además, son tolerantes al calor, activos a pH ácido y no ofrecen cambios de sabor o de textura cuando se utilizan como conservadores. Aunque estas, generalmente, no son activos contra bacterias Gram-negativas (Kumari y col., 2014).

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son péptidos catiónicos de bajo peso molecular (<10 kDa), termoestables, anfifílicos y permeabilizantes de membrana (Rodríguez y col., 2000; Rodríguez y col., 2003).

La mayoría de las bacteriocinas son efectivas contra microorganismos patógenos importantes involucrados en enfermedades transmitidas por alimentos, tales como: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y en menor proporción, *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. (Wu y col., 2004; Jeevaratnam y col., 2005). Debido a esta razón, las bacteriocinas se han convertido en un campo importante de investigación y de estudio en los últimos 25 años (Beristain-Bauza y col., 2012).

La bacteriocina más conocida y estudiada producida por las BAL, es la nisina A. La nisina y las pediocinas son las únicas bacteriocinas aprobadas como aditivos alimentarios (Deegan y col., 2006; Guerra y Pastrana, 2002; Kumari y col., 2014) y son muy estudiadas, no sólo porque exhiben un amplio espectro de actividad, sino también porque son bactericidas en bajas concentraciones y exhiben estabilidad térmica y al pH en los alimentos (De Vuyst y Vandamme, 1994; Ray y Hoover, 1993). La nisina, está aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) se usa en más de 48 países como conservador en alimentos (Cleveland y col., 2001; Deegan y col., 2006), sin embargo, las pediocinas, un grupo de bacteriocinas producidas por las cepas de *Pediococcus*, han recibido gran atención en los últimos años y han sido extensamente estudiadas y bien caracterizadas (Daeschel, 1990; Hoover y col., 1988; Hoover y col., 1989).

Se ha encontrado que varias especies del género *Streptococcus*, producen bacteriocinas, tal como se describe en la tabla 2.

Tabla 2. Ejemplos de bacteriocinas producidas por bacterias del género *Streptococcus*.

Bacteriocina	Bacteria productora	Referencia
SAFF22	<i>S. pyogenes</i>	Tagg y col., 1973
Macedocina	<i>S. macedonicus</i>	Georgalaki y col., 2002
Salivaricina A	<i>S. salivarius</i>	Wescombe y col., 2006
Salivaricina B		Hyink y col., 2007
Bovicina HC5	<i>S. bovis</i> HC5	Mantovani y col., 2002
Mutacina I	<i>S. mutans</i> U140	Qi y col., 2001
Mutacina IV		

Para el uso eficaz de las bacteriocinas como conservadores alimentarios, es necesario disponer de bacteriocinas, de amplio espectro, termoestables, producidas con actividad altamente específica en un medio de calidad alimentaria.

Existen algunas desventajas en cuanto a la producción de bacteriocinas en los procesos de purificación, estos son costosos, largos y requieren mucho tiempo, además, estos procesos son adecuados a escala de laboratorio, pero no siempre a escala industrial (González, 1996; Kumari y col., 2014).

- Clasificación

Las bacteriocinas se clasifican en función de sus estructuras primarias, pesos moleculares y características genéticas. Sin embargo, no existe un esquema de clasificación universal. Originalmente, se reconocieron cuatro clases, pero recientemente los autores las han reducido a tres (Liu y col., 2014a), y se encuentran pequeñas diferencias en la descripción de las subclases entre los diferentes autores (Mokoena, 2017).

Clase I: Los Lantibióticos. Definidos como pequeños péptidos activos que contienen lantionina ó β-metil lantionina (Klaenhammer, 1993). Nisina y lacticina 3147 son los

principales representantes de este grupo. El tipo A se compone de moléculas flexibles relativamente alargadas, en forma de tornillo, cargadas positivamente, anfipáticas. Su masa molecular varía entre 2 y 4 KDa y generalmente actúan a través de la formación de poros, a través de la membrana de despolarización, de la membrana citoplásmica de las especies sensibles. Los antibióticos de tipo B son de estructura globular e interfieren con las reacciones enzimáticas celulares. Su masa molecular se encuentra entre 2 y 3 KDa y no tienen carga neta o una carga neta negativa (Cleveland y col., 2001; Deegan y col., 2006).

Clase II: Los no antibióticos. Las bacteriocinas de clase II también son péptidos activos, relativamente termoestables (<10 KDa), que no contienen lantionina. Este grupo a su vez se divide en subclases (Patton y Don, 2005). Lactacina F y lactococina G son miembros de este grupo (Daw y Falkiner, 1996).

Clase III: Son proteínas lábiles al calor, en general, de gran peso molecular (> 30 KDa). Este grupo no ha sido ampliamente investigado. Las bacteriocinas que representan este grupo son helveticina I por *Lactobacillus helveticus* y enterolisina producidas por *Enterococcus faecium* (Paul-Ros y col., 2002; Todorov y Dicks, 2004; Todorov y Dicks, 2005a y 2005b).

- Biosíntesis

La producción de bacteriocinas en bacterias Gram positivas generalmente ocurre cuando cambia la fase logarítmica a la fase estacionaria. Por ejemplo, la producción de nisina comienza durante la mitad de la fase log y aumenta hasta un máximo a medida que las células ingresan a la fase estacionaria (Buchman y col., 1988).

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados ribosomalmente, que inicialmente son biológicamente inactivos y luego se modifican para alcanzar un estado activo. La producción de bacteriocinas depende de la cepa microbiana y las condiciones de cultivo (Todorov, 2009; Perez y col., 2014; Güllüce y col., 2013).

En general, los genes que codifican la producción de bacteriocina y la inmunidad se organizan en grupos de operones. Se pueden ubicar en elementos genéticos móviles, como el cromosoma en asociación con transposones o plásmidos. Las bacteriocinas recientemente sintetizadas contienen un líder N-terminal. Luego son modificadas por proteínas o aminoácidos codificados por el grupo de genes de bacteriocina antes de que se exporten fuera de la célula. Algunas de las modificaciones incluyen reticuladores tioéter llamados lantioninas o metilantioninas formadas a través de la deshidratación de residuos de serina y treonina seguidos de la adición estereo selectiva intermolecular de cisteínas en los aminoácidos insaturados (Todorov, 2009; Zacharof y Lovitt, 2012; Perez y col., 2014; Güllüce y col. 2013).

Se ha reportado que las funciones de la secuencia líder N-terminal (denominada líder de doble glicina) podrían ser: a) evitar que la bacteriocina sea biológicamente activa mientras está detenida dentro del productor, y b) proporcionar el reconocimiento señal para el sistema de transportación. El líder de doble glicina varía en longitud de 14 residuos hasta aproximadamente 30 residuos (Klaenhammer, 1993, Hävarstein y col., 1994).

Las bacteriocinas, pueden producirse como metabolitos primarios o secundarios o su producción puede ser inducida y regulada por el mecanismo de percepción de cuórum. El espectro de actividad, el modo de acción y las propiedades moleculares, genéticas y bioquímicas son variables, y las proteínas de inmunidad específicas protegen a los microorganismos productores de sus propias bacterias (Ahmad y col., 2017; Favaro y col., 2015; O'Connor y col., 2015; Zacharof y Lovitt, 2012).

Independientemente de la forma de incorporación, la efectividad de las bacteriocinas como conservadores de alimentos depende de la biosíntesis óptima, el nivel y la especificidad de la actividad antimicrobiana y la interacción con los componentes de la matriz alimentaria. Varios estudios realizados para establecer las mejores condiciones para la producción de bacteriocinas por muchas cepas de BAL indican que la biosíntesis de las bacteriocinas no es paralela al crecimiento

bacteriano (Aasen y col., 2003; Verluyten y col., 2004; Delgado y col., 2007; Malheiros y col., 2015; Tashakor y col., 2017; Engelhardt y col., 2018).

- Mecanismo de acción

Se ha encontrado que las bacteriocinas tienen muchos mecanismos de acción distintos. Estos mecanismos se pueden dividir ampliamente en aquellos que están relacionados con la pared celular de la célula blanco y aquellos que son activos principalmente dentro de la célula, afectando la expresión genética y la producción de proteínas (Cotter y col., 2013).

La primera, es la acción de las bacteriocinas que está determinada por la composición de la membrana citoplasmática, la estructura y la expresión de una proteína en función de la inmunidad, además de la composición química del medio ambiente. Recientemente se considera también la existencia de las moléculas superficiales en la membrana de la célula blanco que permiten el acoplamiento con la bacteriocina producida por otra bacteria (Cintas y col., 2001; Heerklotz y col., 2004). Las bacterias Gram-positivas se caracterizan por poseer un alto contenido en lípidos aniónicos en su membrana, en este caso, el modo de acción de las bacteriocinas es la unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada en uno de sus extremos, de este modo se forman poros en la membrana bacteriana, la cual queda permeabilizada, la célula empieza a perder iones y metabolitos fundamentales para su supervivencia y eventualmente se produce la muerte bacteriana (Moll y col., 1999; Bizani y col., 2005). Se ha demostrado que algunos miembros de las bacteriocinas clase I, como la nisina, tienen un modo de acción doble. Pueden unirse al lípido II, el transportador principal de las subunidades de peptidoglicano desde el citoplasma a la pared celular, y por lo tanto evitar la síntesis correcta de la pared celular, lo que lleva a la muerte celular. Además, pueden usar el lípido II como una molécula de acoplamiento para iniciar un proceso de inserción de membrana y formación de poros que conduce a la muerte celular rápida (Cotter y col., 2005) (figura 3).

La inhibición de la biosíntesis del ADN que conlleva a la muerte celular, es considerada el otro mecanismo de acción de estos péptidos antimicrobianos (Brötz y Sahl, 2000). La inhibición de síntesis de ADN y ARN es considerada principalmente un mecanismo de acción contra bacterias Gram negativas (Cotter y col., 2013) (figura 3).

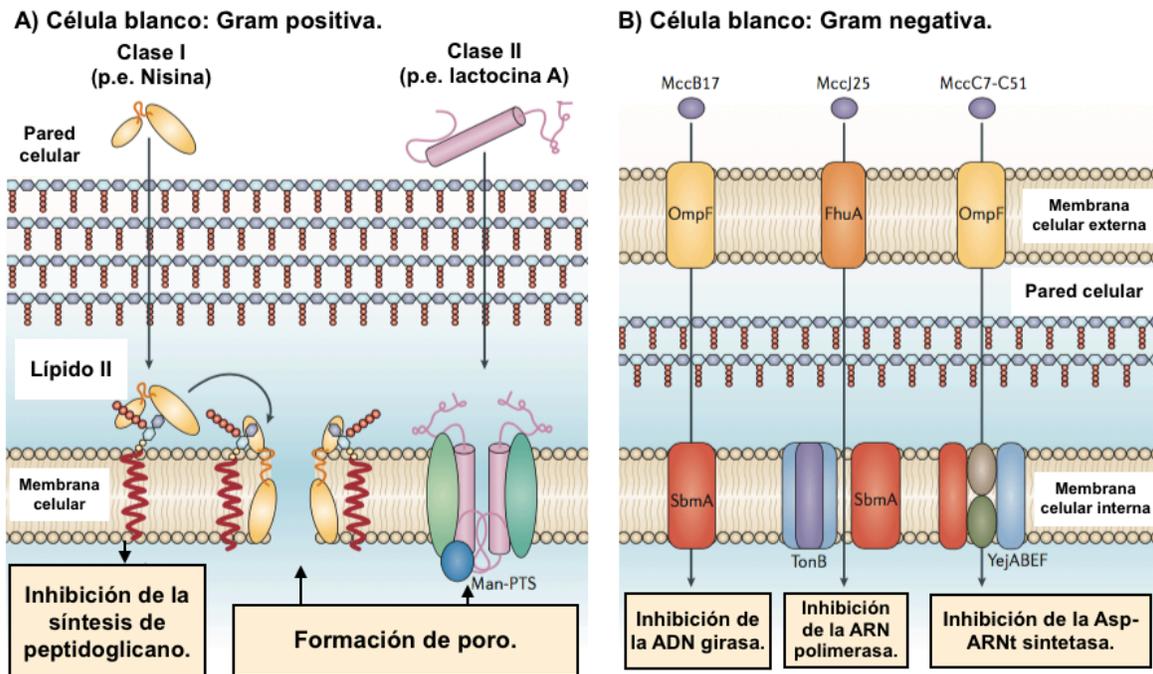


Figura 3. Mecanismo de acción de bacteriocinas frente a bacterias Gram positivas (A) y Gram negativas (B) (Tomado y traducido de Cotter y col., 2013).

De acuerdo con Cintas y col. (2001), la alta actividad bactericida de las bacteriocinas se relaciona principalmente con el contenido de cistina; y de acuerdo con esto, se establecen los tres espectros de acción:

- Bacteriocinas con espectro inhibitorio estrecho, cuyos productos inhiben microorganismos de la misma especie.
- Bacteriocinas con espectro inhibitorio intermedio, cuyos productos inhiben otros géneros de BAL, a algunas bacterias Gram-positivas y a patógenos presentes en alimentos.
- Bacteriocinas con amplio espectro de inhibición, que actúan contra un gran número de bacterias Gram-positivas (Beristain-Bauza y col., 2012).

- Aplicación en la industria de alimentos

La industria alimentaria se ha esforzado por minimizar los riesgos y garantizar la seguridad de sus productos, especialmente mediante el uso de conservadores químicos. Sin embargo, la seguridad toxicológica de los conservadores químicos es primordial y debe ser monitoreada constantemente. Una alternativa que reduciría el uso de conservadores de alimentos clásicos es el uso de metabolitos de microorganismos inoos para inhibir microorganismos indeseables en los alimentos (Adimpong y col., 2012).

En los productos cárnicos se utilizan para inhibir *C. botulinum*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *Salmonella Typhimurium* y *E. coli* (Naidu y col., 2006). También se busca reducir el uso de los nitritos y sus derivados que pueden formar nitrosaminas carcinogénicas (Beristain-Bauza y col., 2012).

Las bacteriocinas son una opción atractiva como conservadores para el desarrollo de alimentos mínimamente procesados. Actualmente se ha demostrado que las bacteriocinas presentan un alto potencial en la conservación 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 y col., 2012). Algunas aplicaciones de la nisina en la industria de alimentos se describen en la tabla 3.

Las bacteriocinas pueden ser utilizadas en alimentos de diferentes maneras:

- Adicionadas directamente al producto, purificadas o semipurificadas.
- Como aditivo en la elaboración de alimentos (Cleveland y col., 2001).

Tabla 3. Aplicación de la nisina en la industria alimentaria.

Alimento	Concentración	Microorganismo susceptible	Referencia
Cerveza	3 mg/L	<i>Lactobacillus brevis</i> CCT 3745	Franchi y col., 2012
	>100 mg/L	<i>Acetobacter aceti</i> CCT 2565	
	0.8 mg/L	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ATCC 9649	
	>200 mg/L	<i>Schizosaccharomyces ludwiggi</i> <i>Saccharomyces diastaticus</i>	
Leche y Huevo líquido	250 mg	<i>Listeria monocytogenes</i> SCOTT A 724	Jin, 2010.
Jugo de manzana y zanahoria	10 UI/mL	<i>Escherichia coli</i> K12 <i>Listeria innocua</i> ATCC51742	Pathanibul y col., 2009
Jugo de naranja	100 UI/mL	<i>Salmonella</i> Typhimurium	Liang y col., 2002
Queso Cheddar	300 UI/mL	<i>Listeria innocua</i>	Benech y col., 2002
	300 UI/mL	<i>Listeria monocytogenes</i> V7 <i>Staphylococcus aureus</i> 196E <i>Clostridium sporogenes</i> PA3679	Zottola y col., 1994

(Tomado de Beristain-Bauza y col., 2012).

Peptidoglucano hidrolasas

Las peptidoglucano hidrolasas (PGH) son enzimas que hidrolizan los enlaces glucosídicos o peptídicos que se encuentran en el peptidoglicano, el componente principal de las paredes celulares de bacterias, promoviendo así la lisis celular. Las PGH se encuentran en organismos de todos los taxones principales, incluidos animales, plantas, bacterias y virus (Vollmer y col., 2008).

Participan en el crecimiento de la pared celular bacteriana y su regulación y también en diferentes fenómenos de lisis. A menudo es difícil asignar una función distinta a una peptidoglucano hidrolasa por varias razones. En primer lugar, muchas bacterias poseen un alto número de hidrolasas y parecen tener funciones redundantes (Höltje y Tuomanen, 1991; Smith y col., 2000). En segundo lugar, una hidrolasa puede tener más de una función (Heidrich y col., 2001 y 2002).

El peptidoglicano (o mureína) forma una barrera que encierra la membrana plasmática y protege la célula contra la presión osmótica interna en condiciones hiposmóticas (Weidel y Pelzer, 1964). El peptidoglicano consiste en cadenas de glicano de N-acetilglucosamina alternadas con enlaces beta-1,4 y residuos de ácido N-acetilmilámico entrecruzados entre sí por péptidos cortos formados por L- y D-aminoácidos (Schleifer y Kandler, 1972). Durante el crecimiento, se requiere la inserción de nuevos precursores y la separación de las células hijas, y se requiere romper de manera controlada la molécula de peptidoglicano (Foster y Popham, 2001). Las enzimas responsables de este proceso son las PGH.

La orientación de los PGH a su ubicación específica es un factor esencial para evitar la lisis celular al tiempo que se asume la separación de las células hijas (Layec y col., 2008).

Los géneros *Streptococcus* y *Lactobacillus* se caracterizan por la producción de un número relativamente pequeño de PGH, en comparación con los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Layec y col., 2008).

Existen enzimas específicas para romper casi todos los enlaces covalentes de peptidoglicano. De acuerdo con el enlace específico, se definen distintas clases de PGH (Ghuysen, 1968; Shockman y Barret, 1983, Shockman y Holtje, 1994). En la figura 4, se describe la estructura del peptidoglicano de bacterias Gram positivas y la especificidad de sus PGH. Las flechas apuntan a enlaces específicos divididos por cada categoría de PGH.

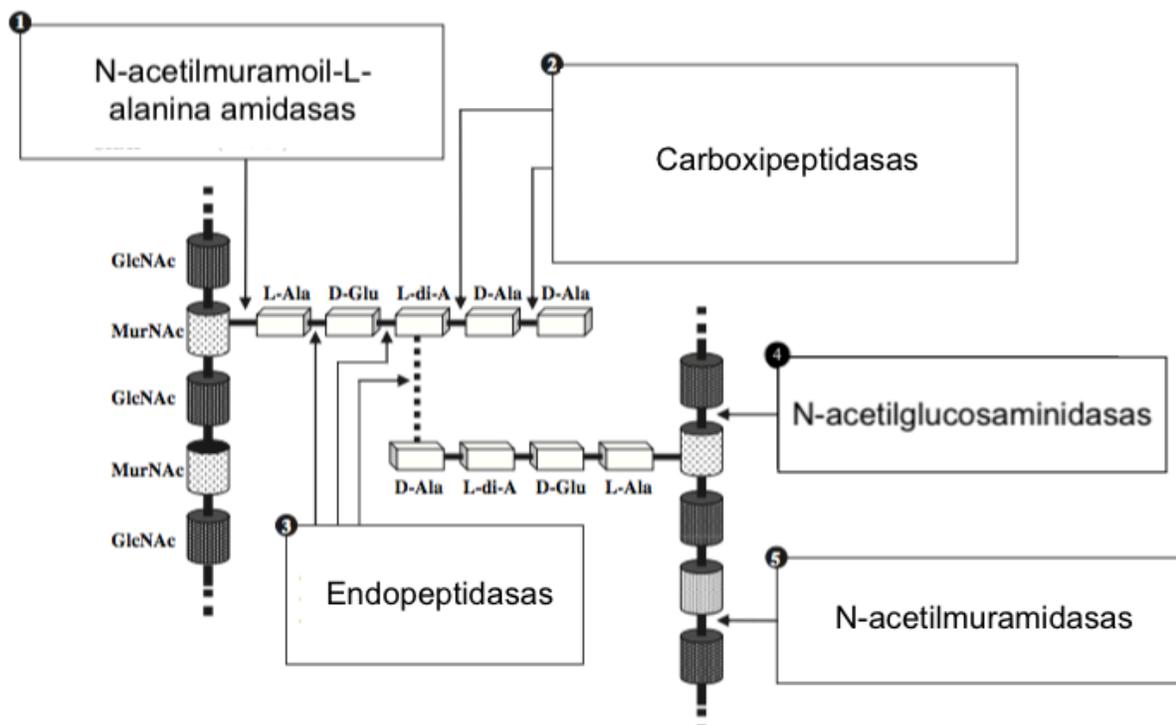


Figura 4. Estructura esquemática de peptidoglicano de bacterias Gram-positivas y especificidad de sus PGH (Tomado y traducido de Layec y col., 2008).

Un ejemplo específico del uso de PGH en la industria alimentaria es la lisozima, que es una N-acetilmuramidasa, utilizada por las plantas y los animales como mecanismo de defensa contra las bacterias patógenas (Nakimbugwe y col., 2006; Maidment y col. 2009).

La lisostafina es otro ejemplo de PGH útil en la industria. Esta enzima es producida por *Staphylococcus simulans* y puede actuar en contra de *Staphylococcus aureus*, un patógeno importante en la industria alimentaria, veterinaria y médica (Szweda y col., 2012). Es dependiente de Zn^{2+} , con un peso molecular de 27 kDa (Turner y col., 2007). Su principal inconveniente es que proviene de una cepa patógena; por lo tanto, en los últimos años, la lisostafina ha sido clonada y producida industrialmente en sistemas heterólogos tales como BAL, que están reconocidos por la FDA como generalmente reconocidos como seguros (GRAS, por sus siglas en inglés) (García-Cano y col., 2015).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes es un bacilo pequeño, anaerobio facultativo, no esporulado, catalasa positiva, oxidasa negativo y Gram positivo (Farber y Peterkin, 1991; Bille y col., 2003).

L. monocytogenes tiene una amplia distribución en la naturaleza y se puede encontrar en el suelo, el agua, la vegetación y las heces de algunos animales. Entonces, contamina fácilmente los alimentos (OMS, 2018). Se ha comprobado que puede proliferar en condiciones extremas, por ejemplo, puede desarrollarse en temperaturas de hasta 0°C y pH de hasta 4.2 (OMS, 2004), factores por los cuales la inhibición de este patógeno es de gran interés, sobre todo en la industria alimentaria.

Los alimentos de alto riesgo de ser contaminados con *L. monocytogenes*, son los productos cárnicos listos para comer (carnes y salchichas cocinadas, curadas o fermentadas), quesos blandos y pescados ahumados (OMS, 2018).

La listeriosis es una enfermedad causada por bacterias del género *Listeria*, y *L. monocytogenes* es la principal especie patógena tanto en animales como en humanos (McLauchlin y Jones, 1999).

- Listeriosis

Se da el nombre de listeriosis a las enfermedades causadas por la bacteria *L. monocytogenes*, de las cuales hay brotes en todos los países (OMS, 2018).

En la mayoría de los casos, la listeriosis humana se transmite por alimentos; sin embargo, el proceso de la enfermedad es complejo con múltiples vías de infección (McLauchlin y col., 2004).

La listeriosis es una de las enfermedades de transmisión alimentaria más graves, pero relativamente rara (0.1 a 10 casos anuales por millón de personas, dependiendo del país y la región). Aunque el número de casos es pequeño, la alta tasa de mortalidad de esta infección la convierte en un importante problema de salud pública (OMS, 2018).

Los principales tipos de listeriosis son la invasiva y la no invasiva. La no invasiva, es una forma leve que afecta sobre todo a personas sanas. Los síntomas son diarrea, fiebre, dolor de cabeza y dolores musculares. El periodo de incubación es de días.

La forma invasiva es más grave y afecta a determinados grupos de alto riesgo, como las embarazadas, los pacientes en tratamiento por cáncer, sida o trasplantes de órganos, los ancianos y los lactantes. Se caracteriza por síntomas graves y una alta tasa de mortalidad (20-30%). Entre sus síntomas se encuentran la fiebre, los dolores musculares, la septicemia y la meningitis. El periodo de incubación suele ser de 1 a 2 semanas, pero puede oscilar entre algunos días y 3 meses.

La probabilidad de contraer la enfermedad es unas 20 veces mayor en las embarazadas que en otros adultos sanos. Puede ser causa de aborto espontáneo o muerte fetal (OMS, 2018). Durante el primer trimestre de embarazo, la listeriosis puede provocar abortos espontáneos, a medida que el embarazo llega al tercer trimestre, la madre corre mayores riesgos. La mayoría de las veces, las mujeres embarazadas infectadas con listeriosis no se sienten enfermas y pueden transmitir la infección a sus fetos, sin siquiera saberlo. La listeriosis también puede provocar partos prematuros, nacimientos de bebés con bajo peso o la muerte de bebés. Los fetos que contraen una infección tardía pueden desarrollar una amplia gama de

problemas de salud, incluidos capacidad mental disminuida, parálisis, crisis epilépticas, ceguera o trastornos cerebrales, cardíacos o renales. En los recién nacidos, la bacteria *L. monocytogenes* puede provocar infecciones sanguíneas y meningitis (FDA, 2018).

Los pacientes con VIH/sida tienen una probabilidad 300 veces mayor de sufrir listeriosis que las personas con un sistema inmunitario normal.

El periodo de incubación hace que resulte difícil identificar el alimento que está en el origen de la infección (OMS, 2018). Por esta razón, la prevención de la listeriosis es muy importante (FDA, 2018).

Justificación

La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasas de letalidad altas (20-30%), esta es causada por *Listeria monocytogenes*, quien está ampliamente extendida en el ambiente y en los alimentos. Se ha comprobado que *L. monocytogenes* puede proliferar en alimentos en condiciones extremas, por ejemplo, puede desarrollarse en temperaturas de hasta 0°C y pH de hasta 4.2 (OMS, 2004), factores por los cuales la inhibición de este patógeno es de gran interés, sobre todo en la industria alimentaria.

En un trabajo previo (Maldonado, 2016), se comprobó, mediante pruebas de difusión en agar, que la cepa de *Streptococcus* spp. A45212 aislada del pozol, produce una sustancia de origen proteico que inhibe el crecimiento de la bacteria patógena *L. monocytogenes*.

Los resultados obtenidos en esta investigación permitirán encontrar la manera de concentrar, purificar y caracterizar esta proteína, ello podría permitir probar dicha proteína como conservador en la industria alimentaria.

Hipótesis

Si la cepa de *Streptococcus* spp. A45212 produce una sustancia antimicrobiana de naturaleza proteica, similar a bactericinas reportadas, capaz de inhibir a *L. monocytogenes*, entonces será posible concentrarla, purificarla y caracterizarla, lo cual permitirá estudiarla con más detalle.

Objetivos

Objetivo General

Producir, concentrar, purificar y caracterizar la sustancia de origen proteico, con actividad antimicrobiana, que genera *Streptococcus* spp. A45212, aislada del pozol.

Objetivos Particulares

- Producir en medio MRS la sustancia proteica generada por *Streptococcus* spp. A45212, evaluando la actividad antimicrobiana de su sobrenadante, contra *L. monocytogenes* mediante la prueba de difusión en agar.
- Separar la sustancia antimicrobiana por dos metodologías diferentes: mediante la adición de sulfato de amonio y por el método adsorción-desorción; y comprobar mediante pruebas de difusión en agar, la actividad antibacteriana contra *L. monocytogenes*, de las fracciones obtenidas mediante ambos métodos.
- Evaluar mediante un zimograma la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua* de las muestras obtenidas y estimar la masa molecular de la proteína mediante una electroforesis (SDS PAGE).

Metodología

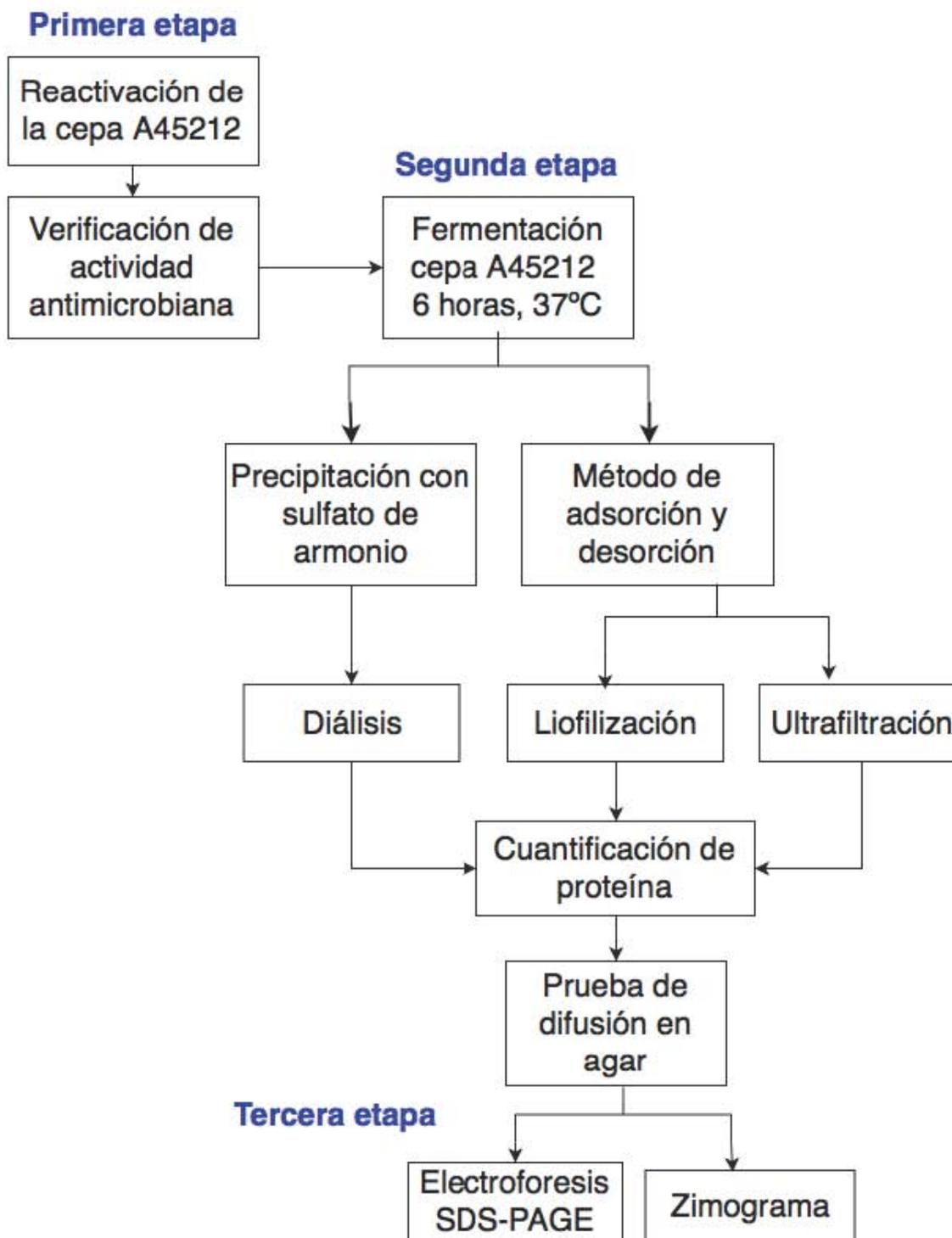


Figura 5. Diagrama general de la metodología seguida en este proyecto.

Microorganismos utilizados

BAL

Para este trabajo se utilizó la cepa *Streptococcus* spp. A45212, la cual fue aislada e identificada en un estudio previo, del pozol de una región de Villahermosa, Tabasco (Díaz Ruíz, 2003; Maldonado, 2016). La cepa se encontraba almacenada a -70° C, en caldo MRS con 20% glicerol, en el laboratorio 324 del conjunto E perteneciente a la Facultad de Química, UNAM.

Microorganismos indicadores. Ensayo de actividad antimicrobiana

Se utilizaron las bacterias *Listeria monocytogenes* CFQ-103 y *Listeria innocua* 1 de la colección de microorganismos del cepario de la Facultad de Química, para comprobar la actividad antimicrobiana de la cepa A45212. Ambas se encontraban almacenadas a -70° C, en caldo BHI con 20% glicerol cada una, en el laboratorio 324 del conjunto E perteneciente a la Facultad de Química, UNAM.

Reactivación de cepas

Se tomaron 50 µL de la BAL conservada en congelación y se depositaron en 5 mL de caldo MRS, se incubó a 30°C. A las 24 h de crecimiento de este cultivo, se realizó un segundo cultivo de la misma forma a partir del primero y se dejó incubando bajo las mismas condiciones.

Para las bacterias del género *Listeria* se realizó el mismo procedimiento, pero en caldo BHI y a una temperatura de incubación de 37°C.

Conservación de cepas

Se tomó 1 mL del cultivo de la BAL reactivada y se centrifugó a 10,000 rpm, 10 minutos a temperatura ambiente, se separó el sobrenadante y se conservaron las células, ahí mismo se depositó 1 mL del mismo cultivo reactivado y se centrifugó a las mismas condiciones. Se lavaron las células con 1 mL de solución salina al 0.85% estéril, después de separar la solución salina de las células por centrifugación, se depositaron 0.7 mL de medio MRS con glicerol al 20% estéril, se agitó hasta la

completa homogenización y se transfirió a criotubos estériles, una vez ahí se depositaron otros 0.7 mL de medio MRS con glicerol al 20% estéril, se homogenizó y se conservó a -70°C .

Para las bacterias del género *Listeria* se realizó el mismo procedimiento, pero en caldo BHI con glicerol al 20%.

Obtención de sobrenadante de la cepa A45212

Se inoculó un cultivo de 100 mL de caldo MRS al 1% de la cepa A45212 reactivada, tal como se describió previamente, se incubó a 37°C , durante 6 horas. Después, el cultivo se centrifugó a 10,000 rpm, 10 minutos a 4°C , se descartaron las células y se conservó el sobrenadante en refrigeración hasta ser utilizado.

Pruebas de difusión agar

Se utilizó un cultivo de la bacteria *L. monocytogenes* reactivada, tal como se describió anteriormente, para realizar una dilución 10^{-2} , para esto, se dejó crecer la bacteria reactivada durante 6 horas a 37°C , en caldo BHI. Se tomaron 0.5 mL de este cultivo y se depositaron en 4.5 mL de solución salina (ss) estéril al 0.85%, se homogenizó bien y a partir de este (dilución 10^{-1}), se tomaron 0.5 mL y se colocaron en un vial con 4.5 mL de solución salina estéril al 0.85% (dilución 10^{-2}).

Para inocular la sobre capa, se tomaron 40 μL de la dilución 10^{-2} y se depositaron en 10 mL de medio agar BHI tamponado fundido (Anexo B).

En placas de agar BHI tamponado (Anexo B) se colocaron 4 cilindros de vidrio estéril. Se agregó la sobre capa fundida previamente inoculada, para formar pocillos cuando el agar solidificase. Se retiraron los cilindros de vidrio y se llenaron los pocillos con 80 μL cada uno, dos de ellos con el sobrenadante obtenido de la cepa A45212, uno con control negativo (agua estéril) y otro como control positivo (clorhexidina al 0.2%). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h (figura 6). Se midió el diámetro (en cm) de la zona de inhibición alrededor de los pocillos en cada placa. El ensayo se realizó por duplicado.

Una vez comprobada la actividad antimicrobiana del sobrenadante de la cepa de A45212, se realizaron más pruebas de difusión en agar, para probar las muestras obtenidas en el estudio más adelante, usando el sobrenadante de la cepa A45212 como control positivo.

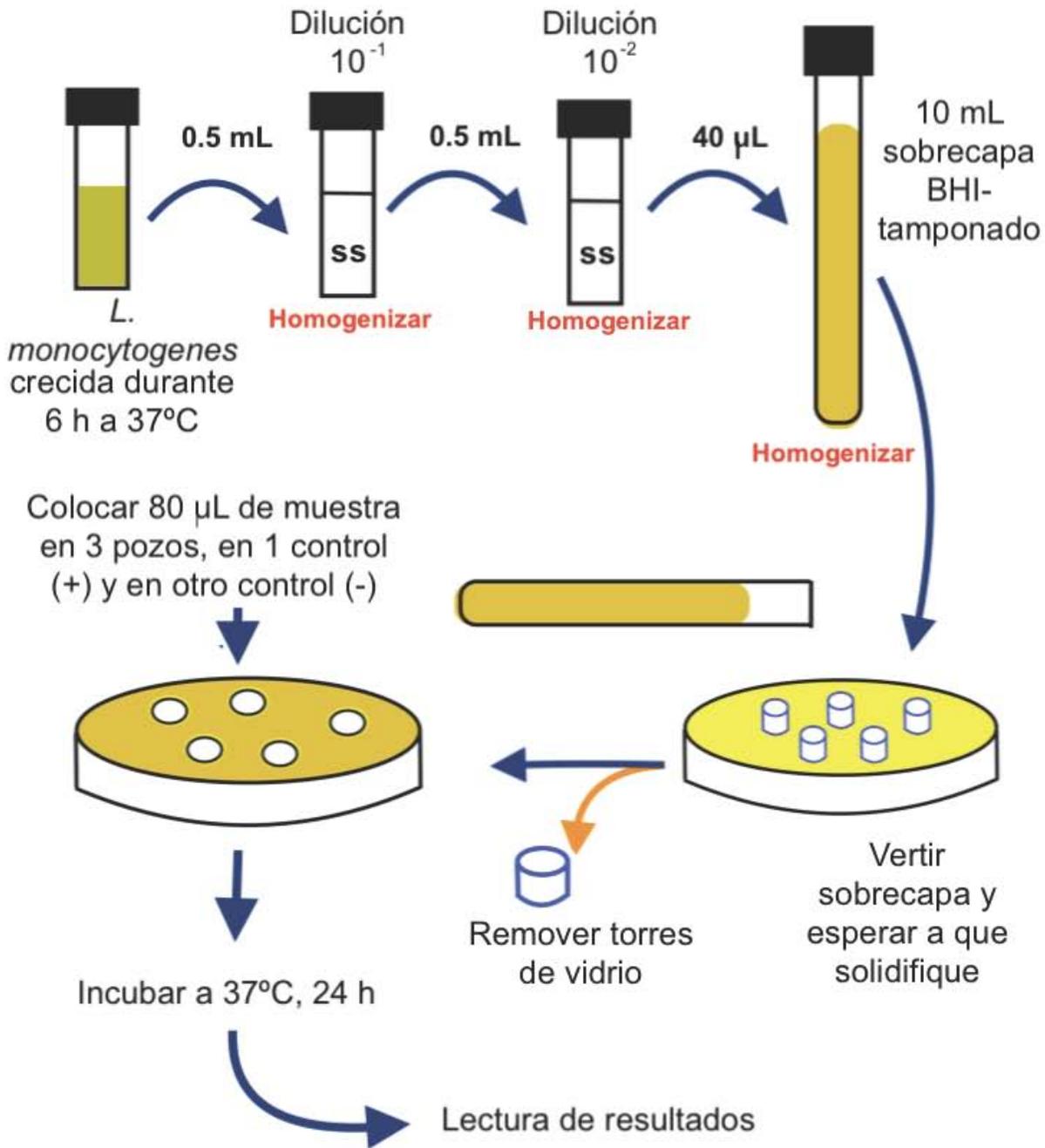


Figura 6. Diagrama de la metodología de la prueba de difusión en agar.

Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

El sobrenadante de la cepa A45212, obtenido como se describió previamente, se precipitó con sulfato de amonio J.T. Baker ®, ((NH₄)₂SO₄), en un rango de concentraciones 45-65%.

Para esto, en un vaso de precipitados sometido a un baño de hielo y en el que se encontraba el sobrenadante en agitación, se agregó la cantidad de sulfato de amonio de manera lenta (Anexo C). Al terminar de agregar el sulfato de amonio, la mezcla se centrifugó a 10,000 rpm, a 4°C, durante 10 minutos, y se tomó una muestra de 1 mL de cada sobrenadante y precipitado (el precipitado se solubilizó en 1 mL de buffer de fosfatos 0.2 M, pH=6.5), durante todas las saturaciones con sulfato de amonio. Las muestras obtenidas fueron almacenadas en refrigeración (4°C) hasta su posterior eliminación de sales (figura 7).

Diálisis

Para la eliminación de sales de la muestra, se introdujo 1 mL de ella en la membrana de celulosa de 3.5 kDa (Spectra/Por3) y se colocaron los sujetadores en los extremos para evitar la salida de muestra. Este procedimiento se realizó con cada una de las fracciones obtenidas de la precipitación con sulfato de amonio.

Las membranas se sumergieron en un vaso de precipitados que contenía 1 L de buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5). El contenido del vaso de precipitados se agitó y se mantuvo en baño de hielo; el buffer de fosfatos fue cambiado cada tres horas durante 24 horas. Pasado el tiempo, las muestras fueron almacenadas en refrigeración. Posteriormente, mediante pruebas de difusión en agar, fue probada su actividad antimicrobiana y se les cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

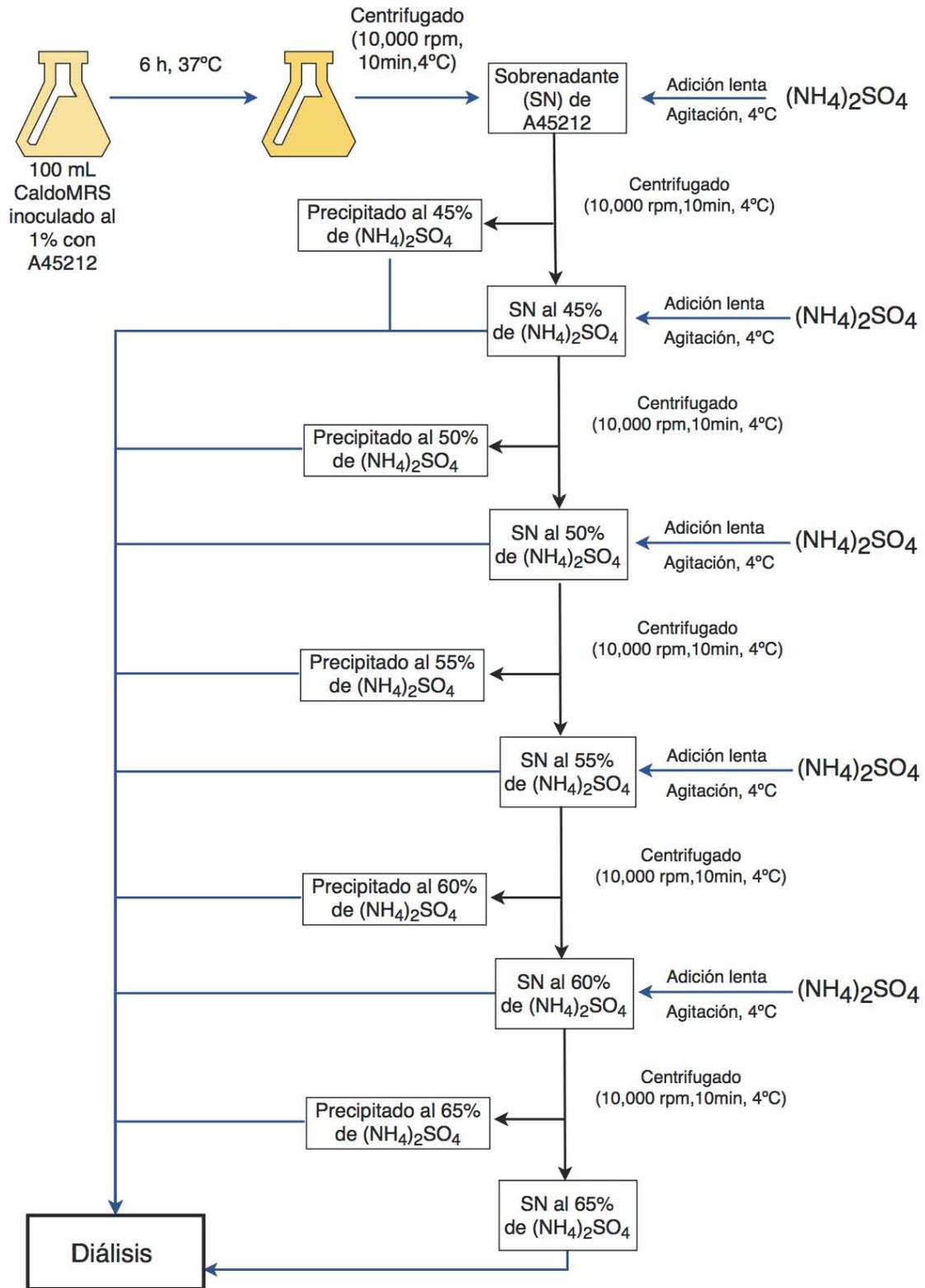


Figura 7. Diagrama de la precipitación con sulfato de amonio.

Adsorción y desorción

Procedimiento A

Dos cultivos (I y II) con 50 mL de caldo MRS inoculados al 1% de la cepa A45212 reactivada (tal como se describió previamente), tras 6 horas de crecimiento a 30°C, se mezclaron y se realizó una adsorción del compuesto antimicrobiano a la pared celular, ajustando el medio a pH 5.5 con NaOH 10 M, después, fueron sometidos a un tratamiento térmico de 70°C durante 25 minutos con el fin de inactivar las proteasas que pudieran encontrarse en el medio.

Pasado el tiempo, las células fueron separadas por centrifugación 15,000 rpm por 15 minutos, a 4°C, las células se lavaron dos veces con buffer de fosfatos (5mM fosfato de sodio, pH=6.5) y se resuspendieron en 50 mL de una solución de NaCl (100mM, pH=2), se agitó 1 hora a 4°C y se separó el sobrenadante nuevamente por centrifugación en las condiciones ya descritas. El paquete celular se resuspendió en buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5), por otro lado, una parte de este sobrenadante se concentró por ultrafiltración con el dispositivo Amicon ® Ultra 15 3K device, y se resuspendió en 500 µL de buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5) y otra parte se precipitó con TCA (Yang y col., 1992) (figura 8). Todas las fracciones obtenidas fueron almacenadas en refrigeración. Posteriormente, mediante pruebas de difusión en agar, fue probada su actividad antimicrobiana y se les cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

Procedimiento B

Dos cultivos (III y IV) con 50 mL de caldo MRS inoculados al 1% de la cepa A45212 reactivada (tal como se describió previamente), tras 6 horas de crecimiento a 30°C, fueron sometidos a un tratamiento térmico de 70°C durante 30 minutos. Se mezclaron los cultivos, se ajustó el pH a 5 con NaOH 10 M y se mantuvo en agitación durante 18 h a 4°C. Pasado el tiempo, se centrifugó a 14000 rpm, durante 15 min a 4°C, el pellet obtenido se lavó dos veces con buffer de fosfatos (5mM, pH=6.5) y nuevamente se centrifugó. Para la desorción, el pellet obtenido se resuspendió en

una solución de metanol al 30% acidificado a pH 1 con HCl 1 N y se agitó durante 18 h a 4°C.

Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 15 mL de agua destilada. En un rotavapor IKA® RV 10 control, se eliminó el metanol presente, 10 min a 65°C 20 rpm. Finalmente, el remanente libre de metanol se concentró en la liofilizadora LABCONCO® 117, la muestra liofilizada se diluyó en 500 µL de buffer fosfatos (0.2 M, pH=6.5), siendo esto la solución (Yang y col., 1992; Segundo, 2017). Todas las fracciones obtenidas fueron almacenadas en refrigeración (figura 8). Posteriormente, mediante pruebas de difusión en agar, fue probada su actividad antimicrobiana y se les cuantificó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

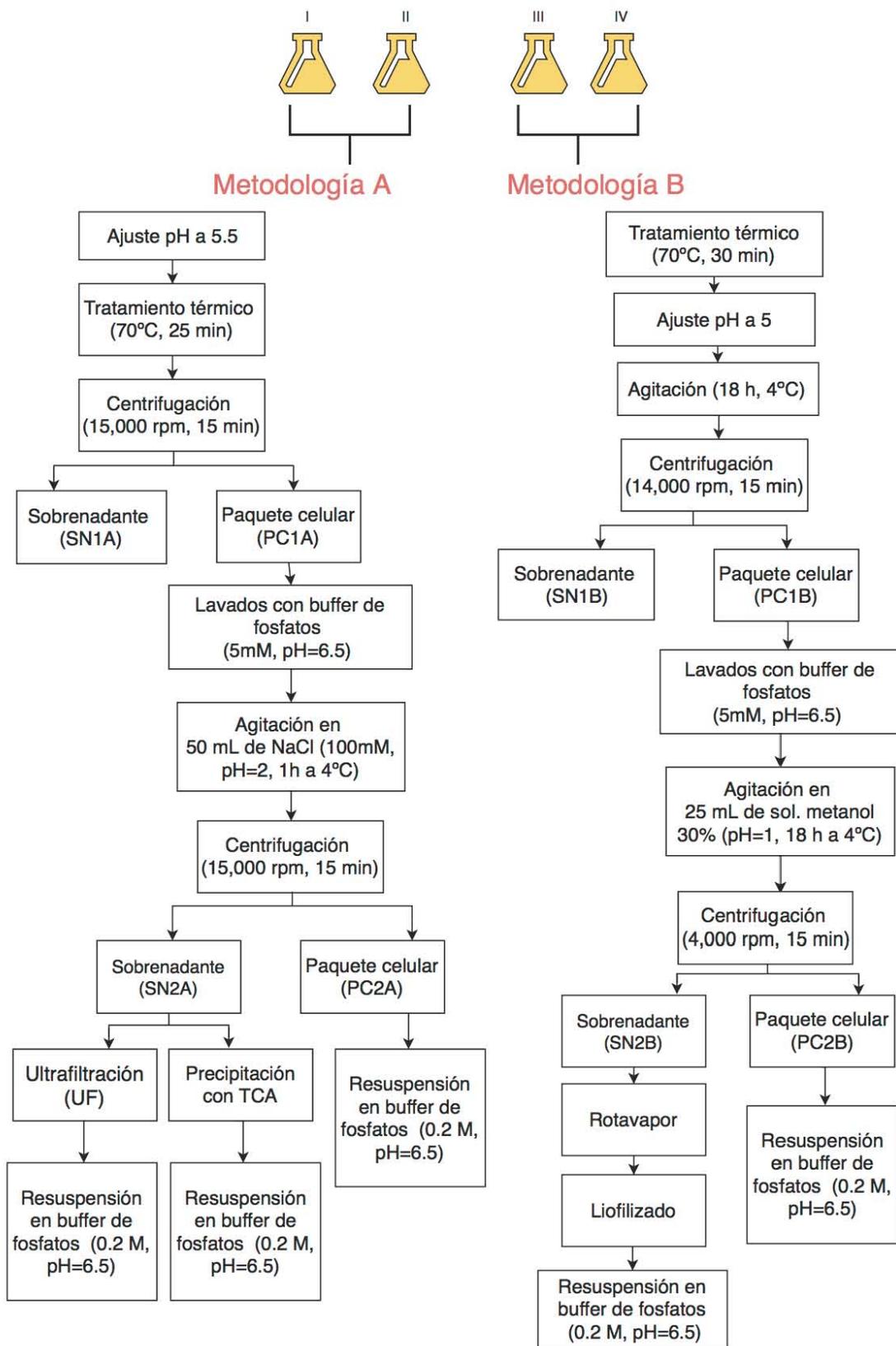


Figura 8. Diagrama de la metodología adsorción y desorción.

Cuantificación de proteína por el método de Bradford

Se vertió 1 mL del reactivo de Bradford Quick Start™ BIORAD® y 20 µL de muestra a la que se le quería cuantificar su proteína, en un tubo Eppendorf®, se homogenizó y se dejó reposar 5 minutos. Se midió su absorbancia en el espectrofotómetro Thermo scientific®, Genesys 10SUV-VIS, a una longitud de onda de 595 nm, y se despejó el valor de la concentración de proteína por la ecuación obtenida por la curva patrón realizada (Anexo D).

Precipitación con TCA

Con el objetivo de concentrar las proteínas en las muestras obtenidas, se realizó una precipitación con TCA (ácido tricloro acético) al 100%. Esta precipitación consistió en añadir 250 µL de TCA a 1 mL de muestra, dejando reposar 15 min en hielo; transcurrido este tiempo se centrifugo 5 minutos, a 10000 rpm, a 4°C, para eliminar el sobrenadante. Se agregó 100 µL de acetona fría al precipitado de proteína, se homogenizó y se centrifugó nuevamente (mismas condiciones). Este lavado se llevó a cabo 2 veces. Para eliminar la acetona remanente se dejó evaporar en la campana de extracción y el precipitado obtenido se resuspendió en buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5).

Preparación de muestras para carga de electroforesis SDS-PAGE

Se agregaron 30 µL de la muestra junto con 10 µL de buffer de carga (Anexo E) y se homogenizó y calentó a 85°C, a 300 rpm, durante 10 minutos en el equipo Eppendorf Thermomixer®.

Electroforesis (SDS-PAGE) y zimograma

La electroforesis en gel de poliacrilamida es un tratamiento para poder separar a las proteínas con base en su masa molecular. Este consiste en la homogenización de la carga con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente que desnaturaliza a las proteínas y las cubre de una carga neta negativa para que migren hacia el polo positivo durante la electroforesis (Peña-Castro y col., 2013).

Los métodos zimográficos se basan en la separación de proteínas por electroforesis (SDS-PAGE) en condiciones desnaturizantes para evitar actividad prematura contra la bacteria (o sustrato) embebida en el gel, seguida de un paso de renaturalización para recobrar la estructura funcional de la proteína, la actividad de la proteína se detecta por su efecto sobre la bacteria que se ha embebido en el gel (Hardt y col., 2003).

Para determinar la masa molecular de las proteínas y para corroborar la actividad del compuesto antimicrobiano con el perfil electroforético de las fracciones en estudio, se realizaron geles SDS-PAGE (gel concentrador 4%; gel separador 16.5%) (Laemmli, 1970) según las tablas 4 y 5. En el caso del zimograma, se utilizaron células de *Listeria innocua*, tras un crecimiento de 12 horas, en 100 mL de caldo BHI a 37°C, inoculado al 1% del cultivo reactivado (tal como se describió previamente), centrifugado a 10,000 rpm, 10 minutos, a 4°C y resuspendidas en 0.5 mL de agua destilada estéril.

Se colocaron en la cámara de electroforesis los geles, junto con 50 mL buffer de electrodos (Anexo E) y 450 mL de agua. En cada pozo se cargaron 20 µL de las muestras preparadas y 5 µL de marcador de peso molecular Precision Plus Protein™ BIO-RAD®. Se corrió la electroforesis a 100 V hasta que salió el frente de corrida de ambos geles y se dejó correr 1:30 h más.

Una vez pasado el tiempo, se lavó el gel del perfil electroforético con agua destilada por 10 minutos y se tiñó con Azul de Coomassie G-250 BIO-RAD®, durante toda la noche y se destiñó con la solución desteñidora 1 (Anexo E), durante 40 minutos y la solución desteñidora 2 (Anexo E), hasta que el gel volviera a su tamaño original. La observación y captura de la imagen se realizó en el equipo Chemidoc BIO-RAD®.

Mientras que el gel para corroborar la actividad antimicrobiana, se lavó con agua destilada por 10 minutos, 3 veces. Se cortó el carril que contenía el marcador de peso molecular. Y, posteriormente el gel se mantuvo en una disolución amortiguadora Tris-HCl 25 mM (pH 7.0) con tritón al 1% a 30°C, durante toda la

noche. El gel se tiñó con azul de metileno (Sigma-Aldrich) al 0.1% en KOH 0.01% y se removió el colorante con agua destilada. Por otro lado, el carril que contenía el marcador de peso molecular se tiñó con Azul de Coomassie, durante toda la noche y se destiñó con la solución desteñidora 1 durante 40 minutos y la solución desteñidora 2, hasta que el gel volviera a su tamaño original. Ambos geles se observaron y capturaron en el equipo Chemidoc BIO-RAD®.

Tabla 4. Formulación de geles para electroforesis SDS-PAGE.

Sustancia	Volumen (mL) para gel separador (16.5% Acrilamida)	Volumen (mL) para gel concentrador (4% Acrilamida)
Agua	1.84	6.08
Buffer Tris HCL 0.65 M 0.4% SDS (pH=6.8)	-	2.50
Buffer Tris HCL 1.5 M 0.2% SDS (pH=8.8)	2.60	-
Acrilamida al 30%- Bis-acrilamida 0.8%	5.50	1.36
Persulfato de amonio (PSA) al 10%	0.05	0.05
N,N,N',N'- tetrametiletildiamina (TEMED) SIGMA®	0.01	0.01
Total	10	10

Tabla 5. Formulación de geles para zimograma.

Sustancia	Volumen (mL) para gel separador (16.5% Acrilamida)	Volumen (mL) para gel concentrador (4% Acrilamida)
Agua	0.84	6.08
Buffer Tris HCl 4x 0.65 M 0.4% SDS (pH=6.8)	-	2.50
Buffer Tris HCl 4x 1.5 M 0.2% SDS (pH=8.8)	2.60	-
Acrilamida al 30%- Bis-acrilamida 0.8%	5.50	1.36
Células de <i>Listeria innocua</i>	1	-
PSA al 10%	0.05	0.05
TEMED SIGMA ®	0.01	0.01
Total	10	10

Resultados y discusión

Primera etapa: Verificación de actividad antimicrobiana del sobrenadante de *Streptococcus* spp. A45212. Método de difusión en agar.

En la tabla 6 se puede observar que se obtuvo una actividad inhibitoria en el sobrenadante obtenido del cultivo de la cepa *Streptococcus* spp. A45212, contra la bacteria *L. monocytogenes* usando el método de difusión en agar con agar tamponado (figura 9). En los resultados de dos repeticiones, el efecto antimicrobiano, fue exactamente igual al causado por la clorhexidina (0.2%).

Uno de los métodos más utilizados para detectar actividad inhibitoria es el de difusión en agar (Liu y col., 2014b). Los compuestos antibacterianos que pueden producir las BAL, que primeramente hay que considerar, son los ácidos orgánicos (Olvera-García y col., 2015), por eso se utilizan medios tamponados, para descartar la actividad inhibitoria de ácidos orgánicos por lo que se puede estar seguro de que la inhibición es causada por la proteína deseada.

Tabla 6. Medida de halos de inhibición generados por el sobrenadante de la cepa *Streptococcus* spp. A45212. Comprobación de actividad antibacteriana.

Tipo de muestra	Medida del diámetro del halo de inhibición (cm) Repetición 1.	Medida del diámetro del halo de inhibición (cm) Repetición 2.
Sobrenadante <i>Streptococcus</i> spp. A45212	2.6	2.7
Sobrenadante <i>Streptococcus</i> spp. A45212 (Repetición)	2.5	2.6
Control positivo (Clorhexidina 0.2%)	2.9	2.7
Control negativo (Agua)	0	0

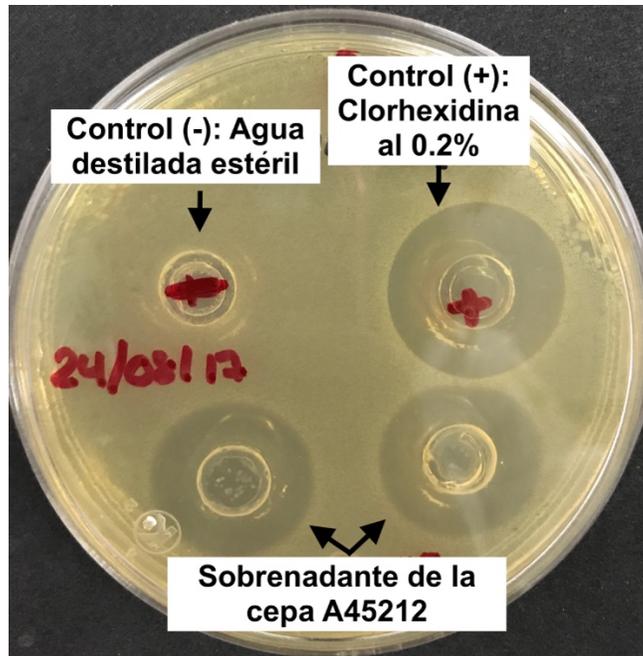


Figura 9. Prueba de difusión en agar. Halos de inhibición sobre *L. monocytogenes* generados por el sobrenadante de *Streptococcus* spp. A45212.

La listeriosis es un problema importante de salud pública porque pone en peligro la vida. La muerte ocurre en aproximadamente el 20 por ciento de los casos (FDA, 2003). Por eso el encontrar una sustancia antimicrobiana, diferente a los ácidos orgánicos, que pueda inhibir a esta bacteria es tan importante. Al tener un resultado positivo en la inhibición de *L. monocytogenes* y al ser repetible este resultado, se demuestra que en el sobrenadante de la cepa *Streptococcus* spp. A45212 hay una sustancia antimicrobiana efectiva. Se sabe que es una sustancia de origen proteico gracias a un estudio realizado previamente (Llanos, 2015; Maldonado 2016), en el que se observó una pérdida de la actividad antibacteriana después del tratamiento del sobrenadante frente a una proteasa.

Así, quedó demostrado que este sobrenadante se podía ocupar para precipitar y purificar la proteína rastreada; así como también se puede utilizar como control positivo en las pruebas de difusión en agar más adelante, para monitorear si se ha podido separar a esta proteína en los procedimientos posteriores.

Segunda etapa: Concentración de proteínas, comprobación de actividad antibacteriana de las muestras obtenidas y cuantificación de proteína.

- Precipitación con sulfato de amonio

Como medio para el inicio de la fermentación de la cepa A45212, se utilizó medio MRS ajustado a un pH de 7.5, y una vez inoculado, se incubó a 37°C, durante 6 horas, debido al estudio realizado por Lara en 2018, en el cual comprobó que estas condiciones son las ideales, para producir una mayor cantidad de sustancia antimicrobiana.

La adición de sulfato de amonio en la cantidad correcta puede precipitar selectivamente algunas proteínas (Prado-Barragán y col., 1999; Nelson y Cox, 2008), se eligió el intervalo de porcentajes de saturación con sulfato de amonio (45, 50, 55, 60 y 65%), porque el sobrenadante de la cepa *Streptococcus bovis* J2 40-2 fue saturada con 40, 50, 60, 70, 80 y 90% de sulfato de amonio para purificar su bacteriocina, así obteniendo la mayor actividad inhibidora al 80% de saturación (Rashid y col., 2009). Con estos datos se decidió empezar la saturación con sulfato de amonio (figura 10) por la primera mitad del intervalo de concentraciones descritas por Rashid y col. en 2009, y al encontrar que el sobrenadante de la cepa A45212, a saturaciones mayores del 55% con sulfato de amonio ya no precipita (tabla 7), no se probaron los porcentajes posteriores descritos.

Tabla 7. Muestras obtenidas de la centrifugación después de la precipitación de la proteína presente en el sobrenadante del cultivo de *Streptococcus* spp. A45212 a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

Concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Sobrenadante	Precipitado
45%	✓	✓
50%	✓	✓
55%	✓	✓
60%	✓	X
65%	✓	X

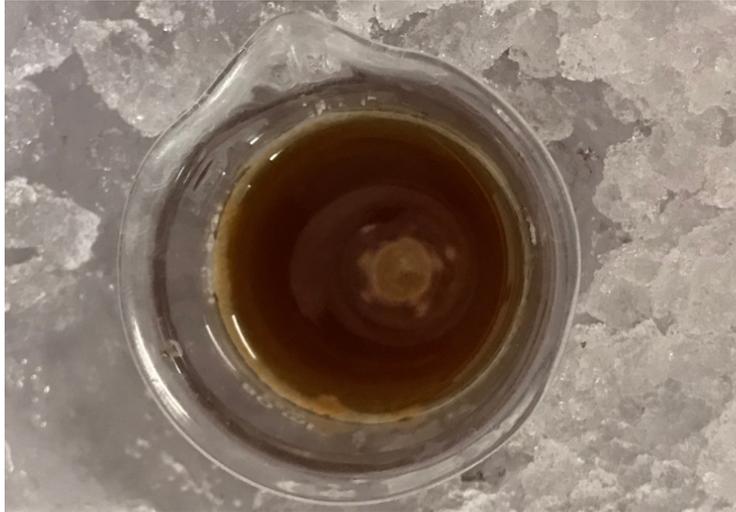


Figura 10. Precipitado obtenido con el 50% de saturación con sulfato de amonio, a partir del sobrenadante de *Streptococcus* spp. A45212.

Debido a que las cantidades residuales de sulfato de amonio presentes en las muestras pueden interferir con otras mediciones y métodos de purificación (Prado-Barragán y col., 1999; Nelson y Cox, 2008), las muestras se dializaron por 24 horas, para eliminar el sulfato de amonio y no afectara, tanto la verificación de actividad antimicrobiana, como la determinación de concentración de proteína por el método de Bradford.

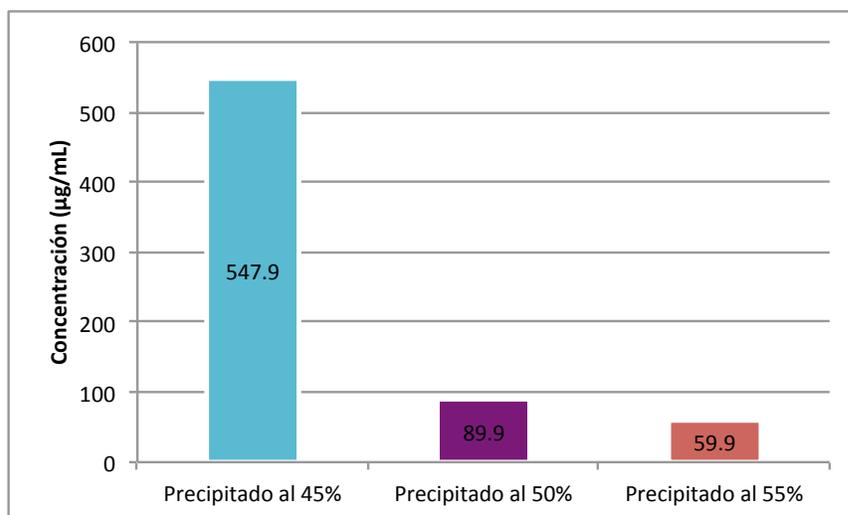


Figura 11. Concentraciones de proteína en los precipitados obtenidos con sulfato de amonio, de los sobrenadantes del cultivo de *Streptococcus* spp. A45212.

Método de Bradford.

Tabla 8. Medida de los halos de inhibición de *L. monocytogenes*. Muestras obtenidas de la diálisis después de la precipitación de proteína a diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

	Tipo de muestra	Repetición 1 (cm)	Repetición 2 (cm)
Lote 1	Control positivo*	2.5	2.6
	Control negativo **	0	0
	Precipitado al 45%	2.8	2.7
	Precipitado al 50%	2.6	2.6
	Precipitado al 55%	2.4	2.3
Lote 2	Control positivo *	2.5	2.4
	Control negativo **	0	0
	Sobrenadante al 45%	1.7	1.8
	Sobrenadante al 50%	1.5	1.4
	Sobrenadante al 55%	0	0
Lote 3	Control positivo *	2.5	2.6
	Control negativo **	0	0
	Sobrenadante al 60%	0	0
	Sobrenadante al 65%	0	0

*Sobrenadante obtenido de la cepa *Streptococcus* spp. A45212

**Agua destilada estéril.

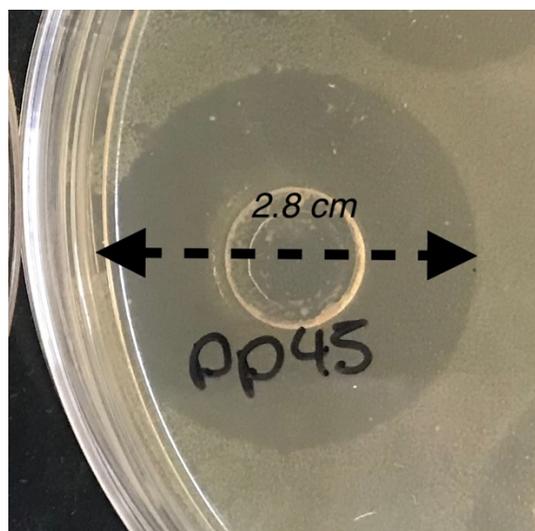


Figura 12. Ejemplo de medida del diámetro de la inhibición de *L. monocytogenes* causada por el precipitado obtenido al 45% de saturación con sulfato de amonio al sobrenadante del cultivo de *Streptococcus* spp. A45212

En la figura 11 se puede observar que el precipitado obtenido con una saturación de sulfato de amonio al 45%, fue el que obtuvo la mayor concentración de proteína. Para verificar que la proteína obtenida tiene efecto antimicrobiano, se realizó la prueba de difusión en agar. En la tabla 8 se muestra que se obtuvo un rango de diámetros de inhibición de 1.4 a 2.8 cm y la condición que generó mayor diámetro del halo de inhibición, fue con el precipitado al 45% de sulfato de amonio (figura 12). Lo que confirma que no solamente se trata de proteína contaminante, pues sí tiene actividad antimicrobiana.

Se tomaron muestras de los sobrenadantes para medir si también había actividad inhibidora contra *L. monocytogenes*, ya que si existiera actividad significaría que la proteína deseada, sigue presente en el sobrenadante y no ha precipitado totalmente; caso que sucedió en los sobrenadantes obtenidos al 45 y 50% de sulfato de amonio, los cuales contenían actividad antimicrobiana.

Respecto al 55% de saturación con sulfato de amonio, se observa en la tabla 7, que es el último precipitado que se obtiene y en la tabla 8, se observa que este precipitado tiene actividad antimicrobiana y que su sobrenadante ya no la tiene, lo que indica que toda la proteína de interés ya fue precipitada.

En las saturaciones de 60 y 65% de sulfato de amonio no se obtuvo precipitado (tabla 7) y se comprueba nuevamente en la prueba de difusión en agar, mostrada en la tabla 8, que en estas dos últimas concentraciones ya no hay proteínas con actividad antimicrobiana, pues ya había precipitado en las saturaciones anteriores.

Como se mencionó en la primera etapa del experimento, se utilizó el sobrenadante de la cepa de *Streptococcus* spp. A45212 como control positivo. Al ser este sobrenadante la referencia de que la cepa A45212 secreta una sustancia antimicrobiana, al someter las muestras obtenidas en la precipitación con sulfato de amonio a la prueba de difusión en agar, se encontraría la concentración óptima de sulfato de amonio para precipitar la mayor cantidad de proteína con actividad antimicrobiana cuando estos precipitados generaran un halo de inhibición más grande al del control positivo.

Se obtuvieron dos muestras que generaron halos de inhibición más grandes que los del control positivo: precipitados a 45 y 50% de sulfato de amonio, sin embargo, en 55% también hubo inhibición y el diámetro del halo generado fue cercano al generado por el del control positivo, lo que significa que no toda la proteína de interés había sido precipitada y aún quedaba una parte, por esto, se espera que la concentración óptima de precipitación con sulfato de amonio estuviera en el intervalo 45-55%; este rango, es cercano a los porcentajes ideales de saturación con sulfato de amonio que se han obtenido para precipitar a las bacteriocinas producidas por otras BAL, como es el caso de las pediocina K23-2 y la macedocina, producidas por *Pediococcus pentosaceus* K23-2 y *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198, respectivamente; que fueron obtenidas a partir de la saturación al 50% con sulfato de amonio (Shin y col., 2008; Georgaliki y col., 2002); y, la bacteriocina L23, producida por *Lactobacillus fermentum* L23, fue precipitada al 60% de sulfato de amonio (Pascual y col., 2008).

- Método de adsorción y desorción

Se realizó este método usando dos procedimientos separados probando diferentes condiciones, pues, en primer lugar, el método B (Segundo, 2017), sin embargo, el tiempo fue muy prolongado y se requería del uso de metanol, por lo que se recurrió a la fuente original, donde Yang y col., en 1992, manejan un menor tiempo para la adsorción y desorción del compuesto antimicrobiano y no usa disolventes orgánicos, los cuales generan residuos. El uso de solventes orgánicos se atribuye a que Atrih y col., en 2001, obtuvieron como resultado que el metanol reduce la adsorción de la proteína, hasta en un 90%, es decir, favorece la desorción.

Para comparar ambos procedimientos, se hizo un seguimiento de la masa de proteína contenida en las muestras, a partir de la masa inicial de proteína que contenían los sobrenadantes (tabla 9). La masa de proteína contenida en los sobrenadantes de la cepa A45212, se consideró como el 100% y así se fue midiendo el porcentaje de la proteína inicial que aún se encontraba en cada fracción obtenida (tabla 10). Este seguimiento se hizo mediante el método de determinación de concentración de proteína, Bradford y tomando en cuenta el volumen en que estaban contenidas las muestras.

Tabla 9. Cantidad de proteína cuantificada por el método de Bradford, al inicio del procedimiento A y B del método de adsorción y desorción.

Procedimiento	Sobrenadante de la cepa A45212	mg de proteína	Cantidad de proteína inicial (mg)
A	I	9.645	17.89
	II	8.245	
B	III	6.045	9.69
	IV	3.645	

Tabla 10. Masa de proteína contenida en las fracciones obtenidas de los procedimientos A y B, del método de adsorción y desorción, determinada mediante el método de Bradford.

Procedimiento	Muestra	mg de proteína	% de proteína inicial	Suma de los porcentajes obtenidos
A	Sobrenadante 1 (SN1A)	7.154	39.989	92.409 %
	Paquete celular 2 (PC2A)	9.378	52.420	
	Ultrafiltrado	-	-	
	Precipitado con TCA	-	-	
B	Sobrenadante 1 (SN1B)	3.074	31.723	99.897 %
	Paquete celular 2 (PC2B)	6.579	67.895	
	Liofilizado	0.027	0.279	

Tabla 11. Medida de halos de inhibición generadas por las muestras obtenidas por los procedimientos A y B, del método de adsorción y desorción.

	Tipo de muestra	Repetición 1 (cm)	Repetición 2 (cm)
Lote 1	Control positivo*	2.6	2.6
	Control negativo **	0	0
	SN1A	2.5	2.6
	PC2A	2.3	2.5
Lote 2	Control positivo *	2.6	2.7
	Control negativo **	0	0
	SN1B	2.2	2.3
	PC2B	2.4	2.4
	Liofilizado	2.5	2.6
Lote 3	Control positivo *	2.7	2.7
	Control negativo **	0	0
	Precipitado con TCA	0	0
	Ultrafiltrado	0	0

*Sobrenadante obtenido de la cepa *Streptococcus* spp. A45212

**Agua destilada estéril.

En la tabla 10, se muestra que el tiempo planteado en el procedimiento A, no fue suficiente tanto para la adsorción, como para la desorción del compuesto antimicrobiano, pues, se ve que una cantidad importante de masa de proteína inicial, se está yendo en fracciones incorrectas, como lo son el sobrenadante 1 (SN1A) y el paquete celular 2 (PC2A). En la tabla 11, se demuestra que este porcentaje de proteína que se está perdiendo, es importante porque tiene actividad antimicrobiana. En el caso de la muestra SN1A, se puede notar por el diámetro de sus halos de inhibición (tabla 11), que hay mayor concentración de la proteína deseada, pues los halos generados son de la misma medida que el control positivo. Por lo que se puede decir que el tiempo para la adsorción no fue suficiente y no se adhirió a la pared celular de la célula, por esto, se perdió desde la primera separación de fracciones; por lo tanto, al llegar al final del procedimiento, no se obtuvieron rastros de proteína en general, ni de la proteína deseada, en las muestras que pasaron por ultrafiltración, ni por la precipitación con TCA.

Por otra parte, mediante el procedimiento B, se observa en la tabla 10 que se perdió una gran proporción de la proteína inicial en las fracciones sobrenadante 1 (SN1B) y el paquete celular 2 (PC2B); sin embargo, mucha de ella se trataba de proteína contaminante, pues al realizar la prueba de difusión en agar, la muestra final liofilizada, es la muestra obtenida que generó un mayor halo de inhibición, mostrado en la tabla 11. Sin embargo, las fracciones separadas SN1B y PC2B, al igual que la muestra liofilizada, mostraron actividad antibacteriana y ésta, causó un halo de inhibición contra *L. monocytogenes* de diámetro cercano al causado por la muestra liofilizada, por lo que se puede decir que, aunque el procedimiento B dio mejores resultados que el procedimiento A, aún no se logra la total adsorción, ni desorción de la proteína antimicrobiana a la pared celular de la cepa A45212.

En ambos procedimientos (A y B), se les dio un tratamiento térmico de 70°C para la inactivación de proteasas, y la proteína deseada, demostró resistir esta condición, pues se pudo observar su actividad antimicrobiana mediante las pruebas de difusión en agar (tabla 11). La termoestabilidad es una característica común dentro de las bacteriocinas producidas por las BAL, que depende de varios factores, como la

etapa de purificación de la bacteriocina, la presencia de protectores térmicos y el pH (Tagg y col., 1976). La resistencia de las bacteriocinas en los sobrenadantes de cultivos libres de células al calentamiento a 100-121°C es una característica común (Cintas, 1995), como ejemplo, la nisina purificada permanece activa después de calentar a 100°C durante 10 minutos a pH 2.0 (Hurst, 1981). Sin embargo, existen bacteriocinas que son extremadamente sensibles al calor, como la caseicina 80 producida por *Lactobacillus casei* (Rammelsberg y Radler, 1990) y la helveticina J producida por *Lactobacillus helveticus* 481 (Joerger y Klaenhammer, 1986).

- Comparación entre métodos: Precipitación con sulfato de amonio y de adsorción y desorción

En esta sección, solamente se comparará el procedimiento B de adsorción y desorción, contra la precipitación de sulfato de amonio, pues este fue más efectivo que el procedimiento A.

Entre ambos métodos realizados para obtener a la proteína deseada hubo diferencia en tiempos, siendo la precipitación con sulfato de amonio más rápida que el método de adsorción y desorción.

Comparando las pruebas de difusión en agar, los halos generados por la actividad antimicrobiana de los precipitados obtenidos por la adición de sulfato de amonio fueron más grandes que los de la muestra liofilizada. Sin embargo, se debe considerar que la proteína de interés en este procedimiento, está repartida en 3 muestras: en los precipitados 45, 50 y 55% de sulfato de amonio.

También se observó que conforme se va avanzando en el proceso del método de adsorción y desorción B, la actividad inhibidora va aumentando, lo que indica que la muestra sí se está concentrando.

Todas las muestras obtenidas, fueron refrigeradas antes y después de usarlas, en un periodo de 30 días, la actividad antimicrobiana de estas no disminuyó ni aumentó durante su almacenamiento en refrigeración (4°C), lo que sugiere su estabilidad en esas condiciones.

Tercera etapa: Evaluación de la actividad antimicrobiana y peso molecular mediante zimografía y electroforesis (SDS-PAGE).

Para definir qué método de los realizados durante la segunda etapa, fue más efectivo para la purificación de la proteína con actividad antimicrobiana, se requirió hacer una electroforesis (SDS-PAGE), ya que es útil para las aplicaciones rutinarias como el seguimiento de los niveles de acumulación de proteínas, así como para su purificación y análisis de peso molecular (Peña-Castro y col., 2013).

En este proyecto fue utilizado un gel al 16.5% de poliacrilamida, ya que esta forma geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas de proteína durante tiempo prolongado, además tiene la ventaja de que, variando la concentración, se puede modificar de manera controlada el tamaño del poro (Campell, 1995). Entre más alta sea la concentración de poliacrilamida, menor será el tamaño de poro y podrá ser utilizado para detectar proteínas de bajo peso molecular.

La alta sensibilidad que tiene el zimograma ayudó a comprobar que se trata de la proteína de interés, pues este método permite una detección simultánea de la actividad de la proteína y una estimación del peso molecular (Hardt y col., 2003). La actividad de la proteína se detecta por su efecto contra *Listeria innocua*. Se utilizó *L. innocua*, pues, *L. monocytogenes* es un patógeno y contaminaría la cámara de electroforesis, así como todo el material utilizado. Todas las muestras cargadas en los geles, fueron preparadas en condiciones desnaturizantes, para evitar la interacción prematura de la proteína con actividad antimicrobiana, con *L. innocua*, y posteriormente se llevó a cabo la renaturalización, para poder observar su actividad.

a) Muestras obtenidas de la saturación con sulfato de amonio al sobrenadante del cultivo *Streptococcus* spp. A45212.

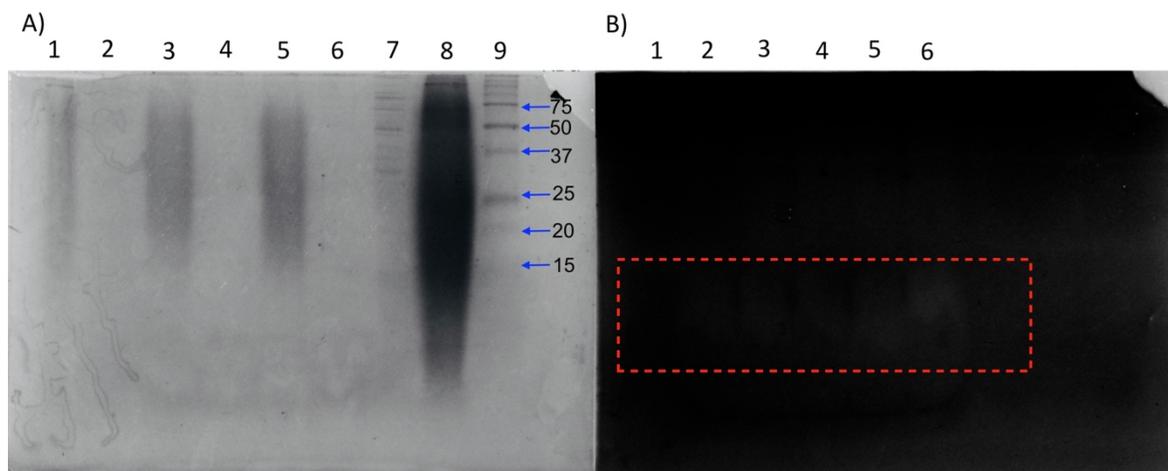


Figura 13. Comparación de geles (16.5% acrilamida) de perfil electroforético de los péptidos y zimograma, muestras obtenidas de la saturación con sulfato de amonio al sobrenadante del cultivo de *Streptococcus* spp. A45212. A) Gel de perfil de proteínas por SDS-PAGE. Carril 1: fracción precipitada al 45% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 2: sobrenadante obtenido al 45% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado; carril 3: fracción precipitada al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 4: sobrenadante obtenido al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado; carril 5: fracción precipitada al 55% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 6: sobrenadante obtenido al 55% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado; carril 7: células de *Listeria innocua*; carril 8: sobrenadante de la cepa *Streptococcus* spp. A45212; carril 9: Marcador de peso molecular BIO-RAD® Precision Plus Protein Standards, All blue. **B)** Detección de la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, zimograma. Carril 1: fracción precipitada al 45% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 2: sobrenadante obtenido al 45% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado; carril 3: fracción precipitada al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 4: sobrenadante obtenido al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado; carril 5: fracción precipitada al 55% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializada; carril 6: sobrenadante obtenido al 55% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y dializado. BIO-RAD® Chemidoc™ Imaging systems.

El gel del perfil electroforético de los péptidos, se cargó con células de *Listeria innocua* y con el sobrenadante de la cepa *Streptococcus* spp. A45212, para tomarlos como control y asegurar que la electroforesis corriera adecuadamente (figura 13).

Ya que, en la prueba de difusión en agar, los sobrenadantes 55, 60 y 65% de sulfato de amonio, no tuvieron actividad antibacteriana, se decidió sólo cargar la primera de estas concentraciones en la electroforesis, para asegurarse de que en realidad la proteína de interés, ya no se encuentra dentro de estas muestras (figura 13).

En la figura 13 (A) se observa que en los carriles cargados con precipitados y sobrenadante de la cepa *Streptococcus* spp. A45212 (carriles 1, 3, 5 y 8, respectivamente) no hay una banda definida, sino barridos de la muestra, esto puede deberse a que la muestra está muy concentrada, de igual forma puede deberse al color del medio de cultivo (MRS) u otro de sus componentes (por ejemplo, grandes cantidades de proteínas), que esté interfiriendo con la definición de bandas aisladas. Por lo que se podría recurrir a un medio que no aporte color a la muestra, ni otras sustancias (Amiali y col., 1998; Guerra y Pastrana, 2002a; Kumari y col., 2014). En adición, se ha demostrado que usar medios químicos definidos, tiene un impacto positivo en la producción de bacteriocina y reducir los pasos de separación y purificación, tal es el de *Enterococcus faecium* Y31 pues al cultivarlo en un medio definido, la producción de la enterocina Y31 aumentó 1.6 veces más que en MRS (Liu y col., 2017).

En la figura 13 (B) se puede observar que la proteína que tiene actividad inhibidora contra *L. innocua*, en el gel, tiene un peso molecular por debajo de 15 kDa. Sin embargo, no está bien definida la banda de inhibición, pudiendo ser de nuevo el problema de concentración de proteína, se tendrían que probar más diluciones a cada uno de los precipitados. También se observa que en el carril 6 no hubo actividad inhibidora contra *L. innocua* por parte del sobrenadante al 55% de sulfato de amonio confirmando el resultado que se obtuvo en la prueba de difusión en agar, en la cual, tampoco tuvo actividad de inhibición. Estos resultados confirman la ausencia de la proteína parecida a bacteriocina en el sobrenadante al 55% de sulfato de amonio, es decir, a esta concentración, toda la proteína de interés había sido precipitada.

b) Método de adsorción y desorción aplicado al sobrenadante del cultivo *Streptococcus* spp. A45212.

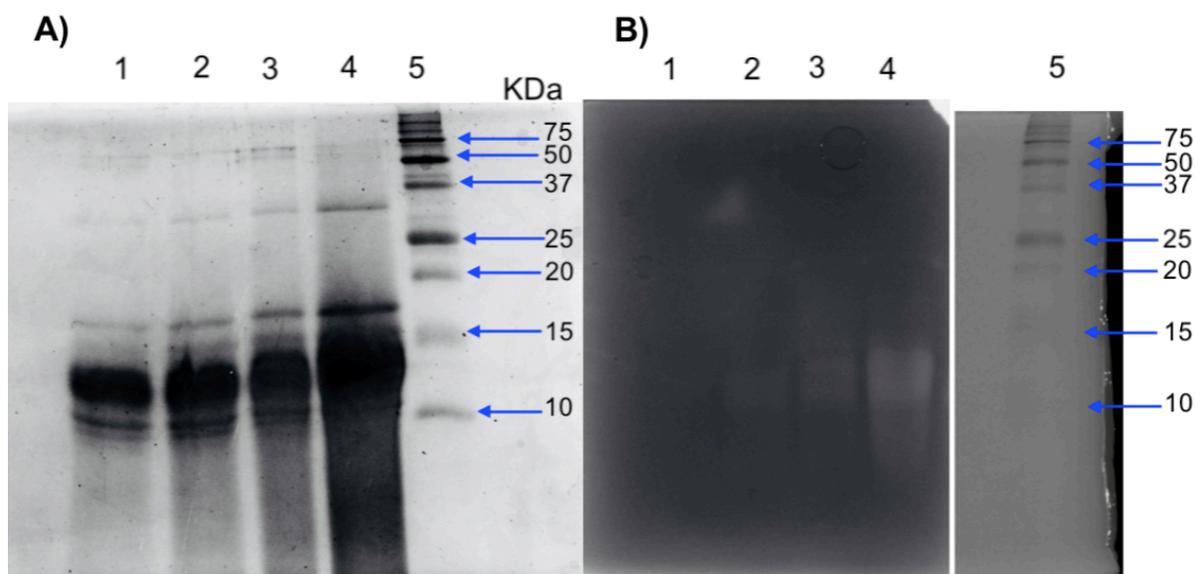


Figura 14. Comparación de geles (16.5% acrilamida) de perfil electroforético de los péptidos y zimograma, de la muestra obtenida por el método de adsorción y desorción, procedimiento B, aplicado al sobrenadante del cultivo *Streptococcus* spp. A45212. A) Gel de perfil de proteínas por SDS-PAGE. Carril 1: Solución con muestra liofilizada diluida (1:10) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 2: Solución con muestra liofilizada diluida (1:5) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 3: Solución con muestra liofilizada diluida (1:3) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 4: solución con muestra liofilizada; carril 5: marcador de peso molecular BIO-RAD ® Precision Plus Protein Standards, All blue. B) Detección de la actividad antimicrobiana contra *Listeria innocua*, zimograma, Incubación en buffer Tris-HCl 25 mM (pH 7.0, tritón al 1% a 30°C, 18 h). Carril 1: Solución con muestra liofilizada diluida (1:10) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 2: Solución con muestra liofilizada diluida (1:5) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 3: Solución con muestra liofilizada diluida (1:3) con buffer de fosfatos (0.2 M, pH=6.5); carril 4: solución con muestra liofilizada; carril 5: marcador de peso molecular BIO-RAD ® Precision Plus Protein Standards, All blue. BIO-RAD ® Chemidoc™ Imaging systems.

En este caso, en los carriles de los geles se cargaron muestras diluidas, pues solamente se tenía una muestra a diferencia del método anterior, que se contaba con más de una muestra.

Se observa en la figura 14 (B), que la actividad antimicrobiana detectada se encuentra entre 10 y 15 KDa, y que el tamaño de las bandas de inhibición, coinciden con algunas detectadas en el gel del perfil electroforético. Se logra ver que entre más concentrada la muestra, causa una mayor inhibición de *L. innocua*.

En la figura 14 (A) se puede observar que conforme es mayor la dilución, se logran definir más las bandas de electroforesis, sin embargo, aún se logran ver los barridos en las muestras. Este barrido disminuye conforme se diluye la muestra, por lo que se podría seguir trabajando con el medio MRS, y diluir la muestra para lograr ver la banda aislada.

Sin embargo, la banda ancha que está entre 10 y 15 KDa no está del todo definida, aunque es poco probable, aún se podría tratar de dos bandas unidas, es decir, dos distintas proteínas de similar peso molecular. Este es uno de los problemas que se presentaron en esta serie de corridas de electroforesis, pues el frente de salida de corrida (figura 15), debía salirse del gel para que se pudiera observar las bandas separadas, aprovechando así la mayor área posible del gel, al ser un gel con el 16.5% de acrilamida, el tiempo de corrida de cada electroforesis fue muy extenso (mayor a 4 horas), y se debía monitorear las bandas del marcador de peso molecular, cuidando que el tiempo no fuera demasiado como para que la banda que indica el menor tamaño este, se saliera del gel. Se estandarizó el tiempo de corrida a detenerlo 1:30 h después que el frente de corrida saliera del gel, a un voltaje de 100 V.

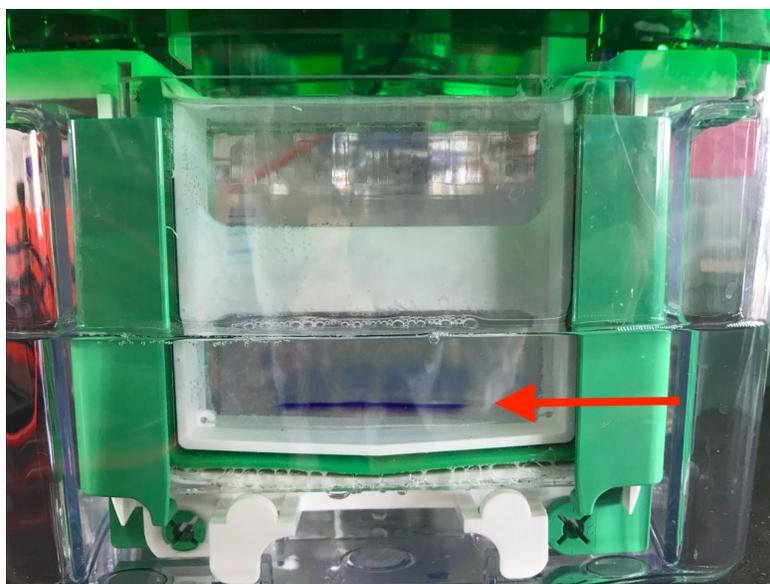


Figura 15. Cámara de electroforesis (SDS-PAGE) encendida, señalando el frente de corrida.

De acuerdo con lo reportado por Maldonado en 2016, se trata de una proteína termorresistente; al ser de origen proteico, se puede tratar tanto de una bacteriocina, como de una petidoglucano hidrolasa.

Según los resultados descritos, tanto en el método de precipitación de sulfato de amonio, como en el de adsorción y desorción, se observó que había una banda de inhibición ancha, entre 10 y 15 KDa, por lo que esta proteína con actividad antimicrobiana, no estaría clasificada en la clase de los lantibióticos de las bacteriocinas (2-4 KDa), ni a la de los no lantibióticos (<10 KDa), a pesar de mostrar resistencia a los tratamientos térmicos dados, tanto para inactivar proteasas (70°C, 30 min) en el caso de adsorción y desorción, como en la preparación de muestra para carga en los carriles de electroforesis (85°C, 10 min), en ambos métodos.

Las bacteriocinas reportadas provenientes del género *Streptococcus* son de menor peso molecular, como lo son: la salivaricina A, producida por *S. salivarius*, con un peso molecular de 2.316 KDa (Wescombe y col., 2006), la salivaricina B, producida

por *S. salivarius*, con un peso molecular de 2.740 KDa (Hyink y col., 2007), la bovicina, producida por *S. bovis* HC5, con un peso molecular de 2.440 KDa (Mantovani y col., 2002) y la mutacina IV, producida por *S. mutans* con un peso molecular de 4.169 y 4.826 KDa (Qi y col., 2001). Mientras que, dentro de las PGH que se reportan del género *Streptococcus*, se encuentran la Mur1, una PGH producida por *S. thermophilus* con un peso molecular de 24.7 KDa (Husson-Kao y col., 2000) y la SkI, producida por *S. mitis* SK137, con un peso molecular entre 31 y 45 kDa (Llull y col., 2006).

Para poder clasificar la proteína rastreada en este estudio, se tendría que realizar una identificación de proteínas, mediante una secuenciación de aminoácidos a partir de bandas bien definidas en el gel de electroforesis (SDS-PAGE).

Conclusiones

Se precipitó la sustancia antimicrobiana presente en el sobrenadante del cultivo de *Streptococcus* spp. A45212 mediante el uso de sulfato de amonio y se comprobó que el rango de concentración sulfato de amonio para la precipitación de la proteína de interés, está entre 45 y 55%, siendo el precipitado de 45% de saturación con sulfato de amonio quien tiene mayor capacidad inhibitoria contra *L. monocytogenes* en las pruebas de difusión en agar.

Se comprobó que, aunque lleva mayor tiempo, el método de adsorción y desorción B, es más eficiente para purificar esta sustancia antimicrobiana, pues se lograron observar bandas mejor definidas en la electroforesis (SDS-PAGE).

La proteína con actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, se encontró, mediante ambos métodos de purificación, entre las bandas de 10 y 15 KDa.

Perspectivas

Sobre la precipitación de proteínas presentes en el sobrenadante de *Streptococcus* spp. A45212 con sulfato de amonio, cerrar el rango y ensayar más concentraciones de sulfato de amonio entre 45 y 55 %.

Probar el crecimiento de *Streptococcus* spp. A45212 en un nuevo medio de cultivo, como lo es el suero de leche o un medio definido como el HSH y encontrar las condiciones óptimas de producción de la sustancia antimicrobiana, y al mismo tiempo que se tengan menos proteínas contaminantes.

Probar diferentes tiempos para la adsorción y desorción de la proteína deseada a la célula de *Streptococcus* spp. A45212 y optimizar el tiempo de purificación.

Encontrar la concentración mínima inhibitoria, de esta proteína contra *Listeria monocytogenes*.

Secuenciación de aminoácidos de la proteína con actividad antimicrobiana, para su identificación como bacteriocina o peptidoglucano hidrolasa.

ANEXOS

Anexo A. Composición de medios de cultivo

Tabla A.1. Composición del caldo MRS Difco ® TM Lactobacilli.

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

Tabla A.2. Composición del caldo BHI OXOID ®.

Componente	g/L
Sólidos de infusión de cerebro	12.5
Sólidos de infusión de corazón	5
Proteasa peptona	10
Glucosa	2
Cloruro de sodio	5
Fosfato de disodico	2.5

Anexo B. Preparación de medios de cultivo

Todos los medios después de esterilizarse pasaron por una prueba de esterilidad, se incubaron a 30°C durante 24 horas.

Caldo BHI

Se utilizó el medio OXOID ®. Como indica la etiqueta, se disolvieron 37 g en 1000 mL de agua destilada caliente y se dividieron en viales con 5 mL cada uno. Posteriormente se esterilizó a 121°C, 15 lb, por 15 minutos.

Caldo MRS

Se utilizó el medio Difco ® TM Lactobacilli. Como indica la etiqueta, se disolvieron 55 g en 1000 mL de agua destilada y se dividieron en viales con 5 mL cada uno. Posteriormente se esterilizó a 121°C, 15 lb, por 15 minutos.

Solución salina 0.85%

Para obtener un volumen final de 100 mL, se pesaron 0.85 g de NaCl J.T. Baker ® y se disuelven en 100 mL de agua destilada. Se vertieron 4.5 mL en viales y se esterilizó a 121°C, 15 lb, por 15 minutos.

BHI en placa, tamponado

Se prepararon 200 mL en un matraz Erlenmeyer, con las cantidades indicadas en la tabla B.1. Se mantuvo en agitación y calentamiento hasta que la solución quedara homogénea. Se esterilizó a 121°C, 15 lb, por 15 minutos y vació en 10 cajas con 20 mL cada una.

BHI para la sobrecapa, tamponado.

Se prepararon 100 mL en un matraz Erlenmeyer con las cantidades indicadas en la tabla B.1. Se mantuvo en agitación y se llevó a ebullición, se dejó 10 minutos más en calentamiento y agitación hasta que la solución quedó homogénea y cristalina; se dividió el medio posteriormente en tubos de ensaye con 10 mL cada uno. Se esterilizó a 121°C, 15 lb, por 15 minutos.

Tabla B.1. Composición de medios BHI tamponados.

	Placa (BHI-t)	Sobrecapa (BHI-t)
BHI OXOID ®	7.4 g	15 g
Agar Bacto ®	3.4 g	0.8 g
Fosfato monobásico de sodio JT BAKER ® (NaH ₂ PO ₄)	0.86 g	0.4 g
Fosfato dibásico de sodio JT BAKER ® (Na ₂ HPO ₄)	2 g	1 g
Agua destilada	200 mL	100 mL

(Tavera, 2010).

Anexo C. Precipitación con sulfato de amonio

Tabla C.1. Cantidades de masa agregadas para la precipitación con sulfato de amonio.

% de saturación sulfato de amonio	Masa agregada de (NH ₄) ₂ SO ₄ (g) a 100 mL de sobrenadante de la cepa A45212
45	26.2
50	2.9
55	3.1
60	3.0
65	3.1

Anexo D. Curva patrón de Bradford

La curva se realizó con albúmina sérica bovina. De la ecuación de la recta se despejó "x" y se obtuvo las concentraciones de proteína para las muestras.

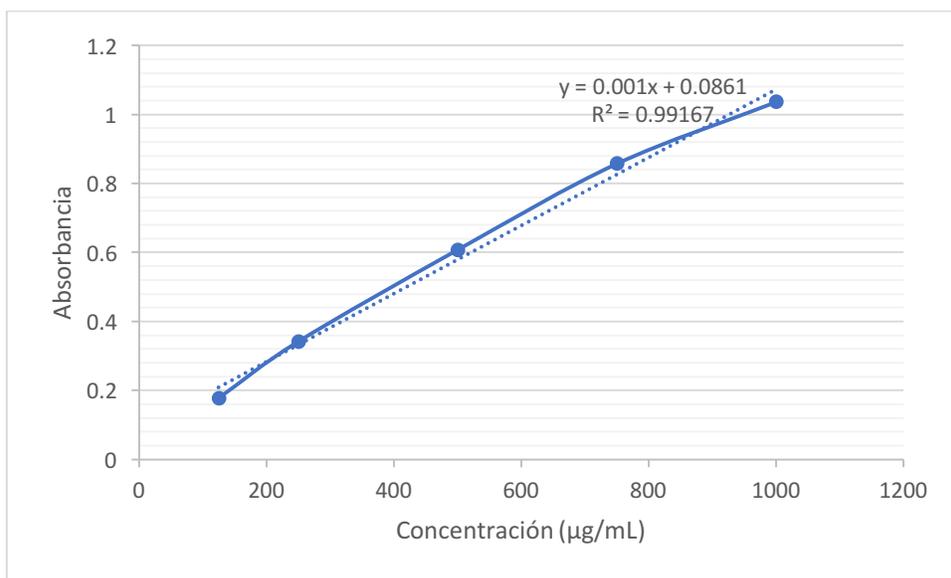


Figura D.1. Curva patrón de Bradford.

Anexo E. Preparación de soluciones utilizadas en la electroforesis (SDS-PAGE)

Acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%

Se debe trabajar con guantes, cubre-bocas y lentes de seguridad, debido a que es una sustancia neurotóxica. Para obtener una solución de 50 mL, se tomaron 15 g de cristales de acrilamida Sigma ® y 0.4 g de cristales de bis-acrilamida Sigma ®. Se colocaron en un vaso de precipitados con 30 mL de agua, se agitó con una barra magnética hasta completa disolución y se llevó a la marca de aforo, a 50 mL con agua. Se almacenó a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 4x (0.65 M, pH=6.8)

Para 100 mL de solución se pesaron 7.874 g de trizma base Sigma ® y 0.4 g de dodecil sulfato de sodio (SDS, Sigma ®). Se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua y se agitó con una barra magnética hasta disolver completamente. Se ajustó el pH a 6.8 con HCl y finalmente se llevó a la marca de aforo, a 100 mL. Y se almacenó a temperatura ambiente.

Buffer Tris-HCl 4x (1.5 M, pH=8.8)

Para 100 mL de solución se pesaron 18.171 g de trizma base Sigma ® y 0.2 g de SDS Sigma ®. Se colocaron en un vaso de precipitados con 70 mL de agua y se agitó con una barra magnética hasta completa disolución. Posteriormente se ajustó el pH a 8.8 con HCl 1N, y se llevó a la marca de aforo, a 100 mL con agua. Y se almacenó a temperatura ambiente.

Solución de persulfato de amonio 10%

Se debe preparar hasta el momento que se vaya a utilizar. Para 1 mL de solución se pesó 0.1 g de persulfato de amonio Sigma ®. Se colocó el volumen de agua y se disolvió totalmente.

Buffer de carga 4x

El buffer de carga, está compuesto por las siguientes sustancias:

- Buffer Tris-HCl (200 mM, pH=6.8)
- 0.05% de azul de bromofenol
- 40% de glicerol
- 8% de SDS
- 5% de β -mercaptoetanol

Para preparar 50 mL de buffer se pesaron 1.2114 g de trizma base, se colocaron en un vaso de precipitados y se disolvieron en un volumen menor a 40 mL de agua, con agitación constante. En el mismo vaso de disolución se colocaron 0.025 g de

cristales de azul de bromofenol, 20 mL de glicerol J.T. Baker® y 4 g de SDS. La disolución se mantuvo en agitación hasta completa disolución, se ajustó el pH a 6.8 con HCl. Se llevó a la marca de aforo, a 50 mL con agua y se almacenó a temperatura ambiente. Justo antes de usarse para realizar la electroforesis, se tomó tomar 1 mL de esta solución y se agregó 0.05 mL de β-mercaptoetanol J.T. Baker®. Las muestras se prepararon colocando 3 partes de muestra de proteína con 1 parte de buffer de carga 4x.

Buffer de electrodos 10x

El buffer de electrodos, está compuesto por las siguientes sustancias:

- Tris base 250 mM
- Glicina 1920 mM
- 1% de SDS

Para preparar 500 mL de buffer se pesaron 72.06 g de glicina y se colocaron lentamente en un vaso de precipitados en un volumen menor a 400 mL de agua, en agitación constante, hasta la completa disolución. Posteriormente, se añadieron 15.1425 g de trizma base y finalmente 5 g de SDS. Al disolverse completamente se llevó a la marca de aforo, a 500 mL y se almacenó a temperatura ambiente.

Para realizar la electroforesis se hizo una dilución 1x del buffer, para lo cual se tomaron 70 mL del buffer 10x y se llevó a un volumen final de 700 mL con agua. Esta nueva solución es la que se colocó en la cámara de electroforesis.

Soluciones desteñidoras de geles

Tabla E.1. Proporción de sustancias en soluciones desteñidoras.

Sustancia	Solución desteñidora 1	Solución desteñidora 2
Agua	50%	88%
Metanol	40%	5%
Ácido acético	10%	7%

Referencias

- Aasen, I.M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L., Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 35–43.
- Adimpong, D., Nielsen, D., Sorensen, K., Derkx, P., Jespersen, L. (2012). Genotypic characterization and safety assessment of lactic acid bacteria from indigenous African fermented food products. *BMC Microbiology*, 12, 1–12.
- Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A., Al Karaawi, M.A., Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: In therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 89, 104–109.
- Amiali, M.N., Lacroix, C., Simard, R.E. (1998). High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 887–894.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Guyot, J.P. (1999). Culture independent quantification of physiologically active microbial groups in fermented foods using rRNA-targeted oligonucleotide probes: application to pozol, a Mexican lactic acid fermented maize dough. *Journal of Applied Microbiology*, 87(1), 131–140.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, J.A., Lebrihi, A., Lefebvre, G. (2001). Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 93-104.
- Axelsson L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. En: Salminen, S. y Wright, A. von (eds.), *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. 2da edición. Marcel Dekker Inc. Nueva York, 1-72.

Becerril, L.A. (2012). Tipificación fenotípica y molecular de cepas de *Streptococcus* spp. y *Enterococcus* spp. aislados de pozol procedente de Villahermosa, Tabasco México. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 97p.

Ben Omar, N., Ampe, F. (2000). Microbial community dynamics during production of the Mexican fermented maize dough pozol. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 3664-3673.

Benech, R.O., Kheadr, E.E., Laridi, E., Lacroix, D. y Fliss, I. (2002). Inhibition of *Listeria innocua* in cheddar cheese by addition of nisin Z in liposomes or by in situ production in mixed culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(8), 3683-3690.

Beristain-Bauza, S.C., Palou, E. y López-Malo, A. (2012). Bacteriocinas: antimicrobianos naturales y su aplicación en los alimentos. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6, 64-78.

Bille, J., Rocourt, J., Swaminathan, B. (2003). *Listeria* and *Erysipelothrix*. En: Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H. et al. (eds). *Manual of clinical microbiology*, Octava edición. ASM, Washington, DC, pp. 461–471

Bizani, D., Motta, A., Morrissy, A., Terra, R., Souto, A. y Brandelli, A. (2005). Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. *International Microbiology*, 8, 125-131.

Brötz, H., Sahl, H.G. (2000). New insights into the mechanism of action of lantibiotics-diverse biological effects by binding to the same molecular target. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46,1-6.

Buchman, G., Banerjee, S., Hansen, J. (1988). Structure, expression and evolution of gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*, 263, 16260–16266.

Burton, J. P., Wescombe P. A., Moore, C. J., Chilcott C. N., and Tagg, J. R. (2006). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:3050–3053.

Campell, M.K. (1995). *Biochemistry*. 2da edición. Nueva York: Saunders College Publishing.

Caplice, E., Fitzgerald, G.F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 50(1-2), 131-49.

Carr, F., Chill, D., Maida, N. (2002). The lactic acid bacteria: A literature survey. *Critical Reviews in Microbiology*, 28(4), 281-370.

Cintas, L.M. (1995). Caracterización bioquímica y genética parcial de la pediocina L50, una nueva bacteriocina producida por *Pediococcus acidilactici* L50 aislado de embutidos crudos curados. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma de Madrid.

Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández, P.E. (2001). Review: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Food Science and Technology International*, 74, 281- 305.

Cleeveland, J., Montville, T., Nes, I., Chikindas, L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobial for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.

Cotter, P.D., Hill. C., Ross, R.P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews of Microbiology*, 3, 777-788.

Cotter, P.D., Ross, R.P., Hill, C. (2013). Bacteriocins, a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews of Microbiology*, 11, 95-105.

Daeschel, M.A. (1990). Application of bacteriocins in food system. En: Bills DD, King SD (eds.) *Biotechnology and food safety*. Boston: Butterworth-Heinemann, 19–103.

Daw, M.A., Falkiner, F.R. (1996). Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron Journal*, 27, 467-479.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hilla, C., Ross, P. (2006). Bacteriocins: biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16, 1058-1071.

Delgado, A., Lopez, F.N.A., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P., Garrido-Fernandez, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of 4% de NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. *Journal of Biotechnology*, 130, 193–201.

De Vuyst, L., Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199.

De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (1994). *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*. Londres: Blackie Academic and Professional.

Díaz-Ruiz, G., Guyot, J.P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., Wachter, C. (2003). Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: A functional role in supporting microbial diversity in pozol, a Mexican fermented maize beverage. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4367–4374.

Díaz-Ruiz, G. (2003). Fermentación de almidón por bacterias lácticas amilolíticas aisladas del pozol. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. 127 p.

Engelhardt, T., Szakmár, K., Kiskó, G., Mohácsi-Farkas, C., Reichart, O. (2018). Combined effect of NaCl and low temperature on antilisterial bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* ST202Ch. *LWT – Food Science and Technology*, 89, 104–109.

Escalante, A., Wachter, C., Farres, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermentes dough pozol as determined by 16S Rdna sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology*, 64, 21-31.

Farber, J.M., Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476–511.

Favaro, L., Penna, A.L.B., Todorov, D. (2015). Bacteriocinogenic lactic acid bacteria from cheeses - application in biopreservation? *Trends in Food Science & Technology*, 41, 37–48.

Franchi, M., Tribst, A., Cristianini, M. (2012). The effect of antimicrobials and bacteriocins on beer spoilage microorganisms. *International Food Research Journal*, 19(2), 783-786.

Food and Drug Administration, 2018. Seguridad alimentaria para futuras mamás: Durante el embarazo – Listeria. Disponible en: <https://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/PeopleAtRisk/ucm083476.htm> [Último acceso 10 julio 2018].

Food and Drug Administration, 2003. *Listeria monocytogenes*, Risk Assessment Questions and Answers. (03/18/2018). Disponible en <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment/ucm208993.htm> [Último acceso el 22 julio de 2018].

Foster, S. J., Popham D. L. 2001. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. *En: Sonen- shein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R. (eds.), Bacillus subtilis and its closest relatives: from genes to cells*. Washington, D.C: ASM Press, 21–41.

García-Cano, I., Campos-Gómez, M., Contreras-Cruz, M., Serrano-Maldonado, C. E., González-Canto, A., Peña-Montes, C., Rodríguez-Sanoja, R., Sánchez, S., Farrés, A. (2015). Expression, purification, and characterization of a bifunctional 99-kDa peptidoglycan hydrolase from *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 99(20), 8563-8573

Georgalaki, M. D., Van Den Berghe, E., Kritikos, D., Devreese, B., Van Beeumen, J., Kalantzopoulos, G., De Vouyst, L., Tsakalidou, E. (2002). Macedocin, a food-grade lantibiotic produced by *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5891-5903.

Ghuysen, J.M. (1968). Use of bacteriolytic enzymes in determination of wall structure and their role in cell metabolism. *Bacteriological Reviews*, 32, 425-464.

Giles, M. (2012). Estudio de la sobrevivencia de enterobacterias aisladas del pozol durante la fermentación láctica de masas y suspensiones de harina de maíz nixtamalizadas. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. 127p.

Gonzalez, M.I. (1996) The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Bioresource Technology*, 57, 1–11.

Guerra, N.P., Pastrana, L. (2002) Dynamics of pediocin biosynthesis in batch fermentation on whey. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 1, 96–106.

Guerra, N.P., Pastrana, L. (2002a) Nisin and pediocin production on mussel-processing waste supplemented with glucose and five nitrogen sources. *Letters Applied Microbiology*, 34, 114–118.

Güllüce, M., Karadayi, M., Baris, Ö. (2013). Bacteriocins: Promising antimicrobials. Microbial pathogens and strategies for combating them. En: Mendes-Vilas, A. (ed.), *Science, Technology and Education*. Madrid: FORMATEX, 1016–1027.

Hardt, M., Guo, Y., Henderson, G., Laine, R.A. (2003). Zymogram with Remazol brilliant blue-labeled *Micrococcus lysodeikticus* cells for the detection of lysozymes: example of a new lysozyme activity in Formosan termite defense secretions. *Analytical Biochemistry*, 312, 73–76.

Hävarstein, L.S., Holo, H., Nes, I.F. (1994). The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common amongst peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiology*, 140, 2383-2389.

Heerklotz, H., Wieprecht, T., Seelig, J. (2004). Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by deuterium NMR. *Journal Physical Chemistry*, 108, 4909-4915.

Heidrich, C., Templin, M.F, Ursinus, A. (2001). Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 41, 167–178.

Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., Höltje, J.V. (2002). Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 184, 6093–6099.

Hoover, D.G., Dishart, K.J., Hermes, M.A. (1989). Antagonistic effect of *Pediococcus* spp. against *Listeria monocytogenes*. *Food Biotechnology*, 3, 183–196.

Hoover, D.G., Walsh, P.M., Kolaetis, K.M., Daly, M.M. (1988). A bacteriocin produced by *Pediococcus* species associated with a 5.5-megadalton plasmid. *Journal of Food Protection.*, 51, 29–31

Holzappel, W.H., Wood, B.J.B. (2014). *Lactic acid bacteria: biodiversity and taxonomy*. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwel.

Höltje, J.V., Tuomanen, E.I. (1991). The murein hydrolases of *Escherichia coli*: properties, functions and impact on the course of infections in vivo. *Journal of General Microbiology*, 137, 441–454.

- Hurst, A. (1981). Nisin. En: Perlman, D. and Laskin, A.I. (eds.), *Advances in Applied Microbiology*. New York: Academic Press, Inc., 85–123.
- Husson-Kao, C., Mengaud, J., Benbadis, L., Chapot-Chartier, M.P. (2000). Mur1, a *Streptococcus thermophilus* peptidoglycan hydrolase devoid of a specific cell wall binding domain. *FEMS Microbiology Letters*, 187, 69–76.
- Hyink, O., Wescombe, P. A., Upton, M., Ragland, N., Burton, J. P., Tagg, J. R. (2007). Salivaricin A2 and the Novel Lantibiotic Salivaricin B Are Encoded at Adjacent Loci on a 190-Kilobase Transmissible Megaplasmid in the Oral Probiotic Strain *Streptococcus salivarius* K12. *Applied & Environmental Microbiology*, 73(4), 1107-1113.
- Jans, C., Meile, L., Lacroix, C., Stevens, M.J.A. (2015). Genomics, evolution, and molecular epidemiology of the *Streptococcus bovis*/*Streptococcus equinus* complex (SBSEC). *Infection, Genetics and Evolution*, 33, 419–436.
- Jeevaratnam, K., Jamuna, M., Bawa, A.S. (2005). Biological preservation of foods-bacteriocins of lactic acid bacteria. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 446-454.
- Jin, T. (2010). Inactivation of *Listeria monocytogenes* in skim milk and egg white by antimicrobial bottle coating with polylactic acid and nisin. *Journal of Food Science*. 75(2), 83-88.
- Joerger, C., Klaenhammer, T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*, 167, 439–446.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 39-86.
- Kolawole, O.M., Kayode, R.M.O., Akinduyo, B. 2007. Proximate and microbial analysis of *Burukutu* and *Pito* produced in Ilorin, Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 6(5), 587–590.

Kumari, A., Kumariya, R., Sood, S.K., Kumar, A., Kapila, S. (2014). Bacteriocin Production and Different Strategies for Their Recovery and Purification. *Probiotics & Antimicrobial Proteins*, 6, 47–58.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.

Lara, E. (2018). Producción y caracterización de compuestos similares a bacteriocinas de una cepa de *Streptococcus* sp. aislada de alimentos fermentados tradicionales. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 90p.

Layec, S., Decaris, B., Leblond-Bourget, N. (2008). Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Research In Microbiology*, 159(7-8), 507-515.

Liang, Z., Mittal, G.S. y Griffiths, M.W. (2002). Inactivation of *Salmonella* Typhimurium in orange juice containing antimicrobial agents by pulsed electric field. *Journal of Food Protection*, 65(7), 1081-1087.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H., Cai, Y. (2014a). *Lactic Acid Bacteria. Biodiversity of lactic acid bacteria*, Dordrecht: Springer Science + Business Media.

Liu, W., Zhang, L., Yi, H., Shi, J., Xue, C., Li, H., Jiao, Y., Shigwedha, N., Du, M., Han, X. (2014b). Qualitative detection of class IIa bacteriocinogenic lactic acid bacteria from traditional Chinese fermented food using a YGNGV-motif-based assay. *Journal of Microbiology Methods*, 100, 121-127.

Liu, W., Zhang, L., Yi, H. (2017). Development of a Chemically Defined Medium for Better Yield and Purification of Enterocin Y31 from *Enterococcus faecium* Y31. *Journal of Food Quality*, 2017, 1-8.

Llanos, A. (2015). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Streptococcus* aisladas del pozol y su efecto en la inhibición de bacterias patógenas presentes en alimentos y en la cavidad oral. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 107 p.

Llull, D., López R., García, E. (2006). Skl, a novel choline-binding N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase of *Streptococcus mitis* SK137 containing a CHAP domain. *FEBS Letters*, 580, 1959–1964

Lugo, O. (2013). Caracterización de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus helveticus*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. 74p.

Maidment, C., Dyson, A., Beard, J. (2009). A study into measuring the anti-bacterial activity of lysozyme-containing foods. *Nutrition and Food Science*, 39, 29–35.

Magnusson, J. (2003). Antifungal activity of lactic acid bacteria. Tesis de doctorado. Swedish University of Agricultural Sciences. 38 p.

Maldonado, C. (2016). Estudio de la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactococcus* aisladas de alimentos fermentados tradicionales. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 103 p.

Malheiros, P.S., Sant'Anna, V., Todorov, S.D., Franco, B.D.G.M. (2015). Optimization of growth and bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 825–834.

Mantovani, H.C., Hu, H., Worobo, R.W., Russell, J.B. (2002). Bovicin HC5, a bacteriocin from *Streptococcus bovis* HC5. *Microbiology*, 148, 3347–3352.

McLauchlin, J., Jones, D. (1999). *Erysipelothrix* and *Listeria*. En: Borriello, S.P., Duerden, B.I. (Eds.), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 9na edición. Systematic Bacteriology, vol. 2. Update 1. CDRom London, Arnold.

McLauchlin, J., Mitchell, R.T., Smerdon, W.J., Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology* 92, 15–33.

Mokoena, P.M. (2017). Lactic Acid Bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: a mini-review. *Molecules*, 22 (8), 1255.

Moll, G.N., Konings, N., Driessen, A. (1999). Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie van Leeuwenhoek*, 76, 185-198.

Montet, D., Ray, R. (2015). *Fermented Foods*, Part I. Boca Raton: CRC Press.

Naidu, A.S., Unal, R., Tulpinski, J. (2006). Bacteriocins: antimicrobial activity and applications. En: Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. (eds). *Food Biotechnology*. Segunda edición. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1391-1437.

Nelson, D.L. y Cox, M.M. (2008). Lehninger. *Principles of Biochemistry*. 5a edición. W. H. Freeman and Company. Nueva York.

Nuraida, L., Wachter, C., Owens, D. (1995). Microbiology of pozol, a mexican fermented maize dough. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 11, 567-571.

Nakimbugwe, D., Masschalck, B., Deckers, D., Callewaert, L., Aertsen, A., Michiels, C.W. (2006). Cell wall substrate specificity of six different lysozymes and lysozyme inhibitory activity of bacterial extracts. *FEMS Microbiology Letters*, 259, 41–6.

O'Connor, P.M., Ross, R.P., Hill, C., Cotter, P.D. (2015). Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. *Current Opinion in Food Science*, 2, 51-57.

Olvera-García, M., Serrano-Maldonado, C. y Quirasco, M. (2015). Detección de proteínas con actividad antibacteriana producidas por bacterias ácido lácticas. *BioTecnología*, 19(1), 25-43.

Organización Mundial de la Salud, 2004. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos. Evaluación de riesgos de *Listeria monocytogenes* en alimentos listos para el consumo. Resumen interpretativo. Disponible en: http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra4_es.pdf [Último acceso el 24 noviembre de 2017]

Organización Mundial de la Salud, 2018. Listeriosis (nota descriptiva). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/listeriosis/es/> [Último acceso 9 julio de 2018].

Ouwehand, A.C. (1998). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: Salminen, S. y Von Wright, A. (eds). *Lactic acid bacteria, Microbiology and functional aspects*. Segunda edición. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 139-160.

Pascual, M.L., Daniele, M., Giordano, W., Pájaro, M., Barberis, I.L. (2008). Purification and partial characterization of novel bacteriocin L23 produced by *Lactobacillus fermentum* L23. *Current Microbiology*, 56, 397–402.

Pathanibul, P., Taylor, T., Davidson, P., Harte, F. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* on apple and carrot juices using high pressure homogenization and nisin. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 316-320.

Patton, G., Don, K. (2005). New developments in lantibiotic biosynthesis and mode of action. *Current Opinion in Microbiology*, 8, 543-551.

Paul-Ross R., Morgan, S., Hill, S. (2002). Preservation and Fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 3-16.

Peña-Castro, J. M., Gregorio-Ramírez, O., Barrera-Figueroa, B.E. (2013) Los métodos experimentales que permiten el estudio de las macromoléculas de la vida: historia, fundamentos y perspectivas. *Educación química*, 24(2), 237-246.

Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): Various structures and applications. *Microbial Cell Factories*, 13, S3.

Prado-Barragán, L.A., Huerta-Ochoa, S., Rodríguez-Serrano, G., Saucedo-Castañeda, G. (1999). *Avances en purificación y aplicación de enzimas en biotecnología. Colección Tópicos en Biotecnología*. 1a edición. Ciudad de México: Universidad Autónoma Metropolitana.

Prescott, M., John, P., Donald, A. (2004). *Microbiología*, 5ta edición, Editorial McGrawHill.

Qi, F., Chen, P., Caufield, P.W. (2001). The group I strain of *Streptococcus mutans*, UA140, produces both the lantibiotic mutacin I and a nonlantibiotic bacteriocin, mutacin IV. *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 15-21.

Ramírez, J.C., Rosas, P., Velázquez, M.Y., Ulloa, J.A., Arce, F. (2011). Bacterias lácticas: importancia en alimentos y sus efectos en la salud. *Fuente*, 2(7), 1-16.

Rammelsberg, M., Radler, F. (1990). Antibacterial polypeptides of *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 177–184.

Rashid, H., Togo, K., Ueda, M. And Miyamoto, T. (2009), Characterization of bacteriocin produced by *Streptococcus bovis* J2 40-2 isolated from traditional fermented milk 'Dahi'. *Animal Science Journal*, 80, 70-78.

Ray, B., Hoover, D.G. (1993). Pediocins. En: Hoover, D.G., Steenson, L. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. Nueva York: Academic Press, 181–210.

Rodríguez, E.G., Gaya, P., Nanez, M., Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria isolated from raw milk. *International Dairy Journal*, 10, 7-15.

Rodríguez, E., Martínez, M.I., Horn, N., Dodd, H.M. (2003). Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 80, 101-116.

Rodríguez, A., Villalva, B. (2010). Estudio del potencial probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 78 p.

Ross, R.P., Morgan, S., Hil, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 3-16.

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

Schleifer, K. H., O. Kandler. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriological reviews*, (36), 407–477.

Segundo, J.A. (2017). Estudio de compuestos antimicrobianos de origen proteico producidos por *Enterococcus faecium* MXVK76. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 71p.

Shin, M.S., Han, S.K., Ryu, J.S., Kim K.S., Lee, W.K. (2008). Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* K23-2 isolated from Kimchi. *Journal of Applied Microbiology*, 105, 331–339

Shockman, G.D., Barrett, J.F. (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 37, 501-527.

Shockman, G.D., Holtje, J.V. (1994). Microbial peptidoglycan (murein) hydrolases. En: Ghuysen, J., Hakenbeck, R. (eds.), *Bacterial Cell Wall*. Londres: Elsevier Science, 131-168.

Sivamaruthi, B., Kesika, P., Chaiyasut, C. (2018). Impact of Fermented Foods on Human Cognitive Function: A Review of Outcome of Clinical Trials. *Scientia Pharmaceutica*, 86(2), 1-6.

Smith, T.J., Blackman, S.A., Foster, S.J. (2000). Autolysins of *Bacillus subtilis*: multiple enzymes with multiple functions. *Microbiology* 146, 249–262.

Somvanshi, A., Patel, A., Jalgaonwala, R. (2017). Effect of Microbial Fermentation and Processing on Nutritional and Antinutritional Properties of Selected Fermented Foods. *Asian Journal of Research in Chemistry*, 10(4), 531-540.

Stollerman, G.H., Dale, J.B. (2008). The importance of the group A *Streptococcus* capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. *Clinical Infectious Diseases*, 46(7), 1038-45

Szweda, P., Schielmann, M., Kotlowski, R., Gorczyca, G., Zalewska, M., Milewski, S. (2012). Peptidoglycan hydrolases-potential weapons against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96,1157–1174.

Tagg, J.R., Read, R.S., McGiven, A.R. (1973). Bacteriocin of a group A *Streptococcus*: partial purification and properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4(3), 214– 221.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40, 722–756.

Tavera, F. (2010). Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas del pozol para la inhibición de bacterias patógenas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 105p.

Tashakor, A., Hosseinzadehdehkordi, M., Emruzi, Z., Gholami, D. (2017). Isolation and identification of a novel bacterium, *Lactobacillus sakei* subsp. dgh strain 5 and optimization of growth conditions for highest antagonistic activity. *Microbial Pathogenesis*, 106, 78–84.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2004). Influence of Growth conditions on the production of a 78bacteriocina by *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* ST 34BR, a strain isolated from barley beer. *Journal of Basic Microbiology*, 44, 305-316.

Todorov, S.D., Dicks L.M.T. (2005a). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. *Enzyme and Microbial Technology Journal*, 36, 318-326.

Todorov, S.D., Dicks, L.M.T. (2005b). Effect on Growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. *Journal of Food Technology and Biotechnology*, 43, 165-173.

Todorov, S.D. (2009). Bacteriocins from *Lactobacillus plantarum*—Production genetic organization. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 209–221.

Turner, M, Waldherr, F., Loessner, M., Giffard, P. (2007). Antimicrobial activity of lysostaphin and a *Listeria monocytogenes* bacteriophage endolysin produced and secreted by lactic acid bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 30, 58–67.

Ulloa, M., Herrera, T., Taboada J. (1983). Mexican pozol, p.226-233. En: K. H. Steinkraus (ed.), *Handbook of indigenous fermented foods*. Marcel Dekker, Nueva York.

Vázquez, S.M., Suárez, H., Zapata, 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.

Verluyten, J., Leroy, F., de Vuyst, L. (2004). Influence of complex nutrient source on growth of and curvacin A production by sausage isolate *Lactobacillus curvatus* LTH 1174. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5081–5088.

Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, (32), 259–286.

Wacher, C. (2014). La Biotecnología Alimentaria antigua: Los alimentos fermentados. *Revista Digital Universitaria*, 15(8), 2-14.

Wacher, C., Cañas, A., Barzana, E., Patricia, L., Ulloa, M., Owens, J. (2000). Microbiology of Indian and Mestizo pozol fermentations. *Food Microbiology*, 17, 251-256.

Weidel, W., H. Pelzer. (1964). Bagshaped macromolecules – a new outlook on bacterial cell walls. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 26, 193–232.

Wescombe, P.A., Upton, M., Dierksen, K.P., Ragland, N.L., Sivabalan, S., Wirawan, R.E., Inglis, M.A., Moore, C., Walker, G., Chilcott, C.N., Jenkinson, H.F., Tagg, J. R. (2006). Production of the lantibiotic salivaricin a and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied & Environmental Microbiology*, 72(2), 1459-1466.

Wu, C.W., Yin, L.J., Jiang, S.T. (2004). Purification and characterization of bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1146-1151.

Yang, R., Johnson, M., Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3355-3359.

Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50–56.

Zottola, E.A., Yezzi, T.L., Ajao, D.B., Roberts, R.F. (1994). Utilization of cheddar cheese containing nisin as an antimicrobial agent in other foods. *International Journal of Food Microbiology*, 1(2), 227-238.