



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

MAESTRÍA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

TESIS

**FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA
PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BACTERIAS
ÁCIDO-LÁCTICAS, AISLADAS DE ALIMENTOS
ARTESANALES**

**Para obtener el Grado de
Maestra en Ciencia de los Alimentos**

PRESENTA

María Soledad Díaz Sánchez

Director

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Comité tutorial

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

Tulancingo de Bravo, Hidalgo; Abril de 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

Maestría en Ciencia de los Alimentos

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos

Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS POR BACTERIAS ÁCIDO-LÁCTICAS, AISLADAS DE ALIMENTOS ARTESANALES", que desarrolla el estudiante María Soledad Díaz Sánchez

Asistentes:

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, María Soledad Díaz Sánchez, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por las profesoras y profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

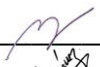
Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 24 de abril de 2024

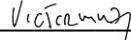
Dr. Norberto Chavarría Hernández

Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández

Dra. Ma. del Rocío López Cuellar

Dr. Víctor Manuel Martínez Juárez





Avenida Universidad km. 1 s/n, Exhacienda Aquetzalpa,
Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México; C.P. 43600
Teléfono +52 (771) 71 72000
maestria_alimentos@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Al **Consejo Nacional de Humanidades Ciencia y Tecnología (CONAHCYT)** por el apoyo brindado con la Beca Nacional de Posgrado con número de becario 797599 (CVU no. 1148704) para la continuación de estudios de maestría.

Al **Instituto de Ciencias Agropecuarias (Icap)** y a la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH)** por el uso directo e indirecto de sus instalaciones, materiales y equipos para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Norberto Chavarría-Hernández**, por la dirección de este trabajo, le agradezco por la oportunidad de colaborar en el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria (CABA), agradezco su dedicación, disposición, enseñanzas, consejos y paciencia que han ayudado a la mejora constante de cada etapa de este proyecto y mi formación profesional.

A la **Dra. Adriana Inés Rodríguez-Hernández**, por su valiosa colaboración, dedicación, constante apoyo, consejos oportunos y sugerencias importantes brindados durante el desarrollo de este proyecto, asimismo para mi formación profesional.

A la **Dra. Ma. Del Rocío López-Cuellar**, por su valiosa colaboración, consejos y apoyo brindado, así como, por sus importantes sugerencias dadas durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco al **Dr. Víctor Manuel Martínez-Juárez**, su gran ayuda y aportación en este trabajo, por compartir sus conocimientos, su amable disposición, consejos y paciencia otorgada durante el desarrollo de este proyecto.

El agradecimiento se extiende a la **Dra. Mayra Alejandra López-Ortega**, **Dr. Miguel Ángel Hernández-Valdepeña**, **Dra. Lorena Trejo-González** por sus importantes contribuciones. Asimismo, a los demás **miembros del CABA** con quienes coincidí durante mi estancia en el laboratorio.

Le agradezco a la **Azucarera San José de Abajo S.A. de C.V.** con domicilio en la Col. Ignacio Vallarta 94910 Cuitláhuac, Ver. que a través de la **Ing. Tania Alvarado Delgado** y el **Ing. Arturo Flores Fuentes** proporcionaron la melaza, un ingrediente valioso para la realización de los medios formulados de este proyecto.

A todos mis profesores de Maestría, gracias por compartir sus conocimientos.

Al personal que labora en el Icap, especialmente a la Q. Maribel López, Q. Claudia Álvarez, Sra. Dulce Martínez y Sra. Sonia Cruz, gracias por su amabilidad y apoyo durante mi estancia.

Agradecimientos

A Dios, por la dicha de la vida, por siempre y en cada momento hacerse presente en ella. Gracias por las bendiciones dadas para poder culminar esta meta. A la Virgen de Guadalupe, mi agradecimiento por siempre estar en cada uno de mis días. *Esta meta sin duda alguna es la oración del ayer manifestándose en el hoy.*

Agradezco muy especialmente a mi abuelita Ramona Guerrero (†), por su valioso amor, apoyo incondicional y por todo lo hecho por mí para que pudiera comenzar esta meta, gracias por tu legado que me sigue impulsando a seguir, *esto es por y para ti.*

A mis padres Nora y Eleuterio Ramón, les agradezco infinitamente su comprensión, confianza, su amor invaluable, sus consejos, su apoyo incondicional y su motivación constante para desde siempre pero hoy más que nunca *poder alcanzar esta meta que es por y para ustedes.*

A mis hermanos Flora Iveth y Eleuterio Ramón por ser un pilar importante para alcanzar esta meta. *¡Todo es posible!*

A toda mi familia; especialmente a los Díaz Rodríguez por su cariño, apoyo, motivación y preocupación por mi bienestar. *¡Gracias por su cariño!*

A mi tía Irma Díaz, tío Zacarías Díaz y tía Socorro Aguilera por su cariño, su confianza, su motivación y siempre estar al pendiente de mí. *Los quiero mucho.*

A mi primo el Dr. David Díaz, por siempre estar al pendiente de mí, por tener tiempo para una palabra, por ser un referente de superación y amor por la profesión. *¡Muchas gracias!*

Al Ing. Jorge Arturo De la Rosa y su esposa Norma González, gracias por su cariño, apoyo y motivación que siempre me dan, por tener para mí *la palabra correcta en todo momento.*

A la Dra. Rosa María Chávez-Santos y el Dr. Anselmo Osorio-Mirón por contagiarme de motivación para continuar en el arduo camino de la ciencia, por su tiempo, cariño, apoyo y por ser un referente para mí. *A hombros de gigantes.*

A mi querida Sra. Mireya Téllez, por alentarme a siempre dar lo mejor y alcanzar lo que uno se propone. Gracias por cada palabra dada, por todo el cariño y apoyo. *Te quiero mucho.*

A mi querida QFB Gabriela Lara, por “reiniciarme el chip”, mostrarme de nuevo la “magia” de la microbiología aplicada, sus consejos, motivación y tiempo. *¡Gracias por todo Gaby! Te quiero mucho.*

A mis compañeros y amigos de generación, especialmente a César, Merari, Carlos y Mirna por compartir esta experiencia y hacerla más agradable, por las risas y frustraciones. *Los quiero mucho.*

A mis queridos amigos, principalmente a: José Luis (“Dr. Chino”) Spinoso, Cindy Lizbeth Santiago, Roberto Durán, Diana Elisa Aguilar, René Aragón, Ana Karen Velázquez, Miguel Hdz, Claudio Mtz, Berenice Rebolledo, Sergio May, Elsy López, Christian Pensamiento, Hesiquio Hdz, Victorio Ávila, Carlos Viveros (“Tesoro”), Héctor Hugo Mariscal (“Tesorito ☺”), Rosendo Sánchez, Jacobo Mouret y a las nuevas amistades hechas durante esta etapa de mi vida, gracias por estar al pendiente de mí, motivarme a alcanzar mis metas, su cariño, consejos y apoyo, *¡gracias por todo!*. Y, por último, pero no menos importante, a las siguientes familias que están al pendiente de mi bienestar, por su motivación, aliento, apoyo y en algunos casos sus oraciones: Cabrera Cortés, Nieves Peña, Rodríguez Vergara, Salas López, Salas Rivera y Salinas Jiménez. *¡Muchas gracias por todo!*

¡A todos muchas gracias por formar parte de este gran logro en mi vida!

Dedicatorias

Le dedico esta tesis a mi madre Nora Sánchez Pérez, a mi padre Eleuterio Ramón Díaz Guerrero, a mis hermanos Flora Iveth y Eleuterio Ramón por su infinito amor, motivación, confianza y apoyo incondicional que me alentó a continuar para concretar esta etapa, sin duda son mi fortaleza, mi inspiración y la razón por la cual me quiero superar como persona y profesionalista, saben de sobra que este trabajo es un logro conjunto y fruto de todos los esfuerzos compartidos como familia.

De igual manera, al “nuevo integrante de la familia”, mi sobrin@, tu llegada coincide con la culminación de esta etapa de mi vida, te dedico esta tesis y solo quiero que sepas tú y los que vendrán, que, unidos como familia, confiando en Dios y trabajo constante los sueños se cumplen...

También dedico esta tesis a quienes ya no pudieron “estar” y nutrieron mi mente y corazón de ganas de superación, valores y mucho amor: mis queridos abuelos (†). Principalmente, mi amada abuelita Ramona (†) “Monchis”, te dedico este trabajo que alcanzaste a ver iniciado el camino, gracias por acompañarme en mis días y noches de estudio, por ser una luz en mi vida, un consuelo y un recordatorio constante de valores; darme aliento para alcanzar mis metas, ser ejemplo de trabajo, esfuerzo, responsabilidad y fe en que “Dios proveerá” pero uno “debe ser responsable y entusiasta con los compromisos adquiridos y metas propuestas”, este trabajo es un tributo a tu legado y enseñanzas que siempre me acompañarán.

Dedico este trabajo a quienes siguen presentes en mi vida, pero también a quienes se han adelantado en el camino, que de alguna manera han contribuido con sus enseñanzas, sus consejos, su confianza, su cariño, sus oraciones y su aliento a forjarme como una mejor persona y profesionalista, a creer en mí y saber que los límites pueden ser rotos a base de trabajo, esfuerzo, entusiasmo y amor por lo que uno hace. Esta tesis es un tributo al legado, influencia y amor que han ejercido en mi vida.

ÍNDICE GENERAL

Resumen	XIV
Abstract	XVI
1.- Introducción	XVIII
2.- Capítulo I	1
Perspectivas de las bacterias ácido lácticas:	1
Producción, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, probióticos y aplicación.	1
2.1.- Alimentos fermentados artesanales.....	1
2.2.- Bacterias ácido lácticas en la elaboración de alimentos fermentados	1
2.3.- Péptidos antimicrobianos	4
2.4.- Bacteriocinas.....	5
2.5.- Factores que afectan la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas.....	6
2.6.- Fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de bacteriocinas.....	8
2.7.- Incidencia de las fuentes minerales y vitaminas en la producción de bacteriocinas.....	8
2.8.- Efectos del pH en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas	8
2.9.- Efecto de la temperatura en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas	9
2.10.- Efecto de la aireación en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas..	9
2.11.- Residuos agroindustriales	9
2.12.- Escalamiento del proceso de producción	10
2.13.- Aplicación.....	11
2.14.- Bacteriocinas en el mercado mundial	11
2.15.- Referencias bibliográficas.....	13
3.- Justificación	18
4.- Hipótesis	19
5.- Objetivos	19
5.1.- Objetivo general.....	19
5.2.- Objetivos específicos.....	19
6.- Capítulo II	20
<i>Enterococcus faecium</i>	20
6.1.- Introducción	20
6.2.- Materiales y métodos	21

6.2.1.- Microorganismos	21
6.2.2.- Medios de cultivo.....	21
6.2.3.- Reactivos químicos.....	22
6.2.4.- Metodología para la producción de <i>Enterococcus faecium</i>	22
6.2.5.- Concentración de biomasa	23
6.2.6.- Determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956).....	24
6.2.7.- Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento.....	25
6.2.8.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop-ND1000	26
6.2.9.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	27
6.2.10.- Análisis estadístico de las CMI	29
6.3.- Resultados y discusiones.....	30
6.3.1.- Rendimiento, velocidad de crecimiento máxima y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales)	37
6.3.4.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop.....	40
6.3.5.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)	41
6.4.- Conclusiones.....	45
7.-Capítulo III	51
<i>Streptococcus infantarius</i>	51
7.1.- Introducción	51
7.2.- Materiales y métodos	51
7.2.7.- Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento.....	54
7.2.8.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop-ND1000	56
7.2.9.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> :	56
7.3.- Resultados y discusiones.....	59
7.3.2.- Concentración de biomasa	60
7.3.3.- Rendimiento, velocidad de crecimiento máxima y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales)	64
7.3.4.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop.....	67
7.3.5.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)	69
7.4.- Conclusiones.....	71

7.5.- Referencias bibliográficas	72
8.- Recomendaciones para futuras investigaciones	76
9.- Anexos	77
Anexo I: Medios de cultivo alternativos	77
Anexo II: Determinaciones analíticas de materias primas para fermentación	78
• A II.1.- Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959).....	78
• A II.2.- Determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956).....	78
• A II.3.- Determinación de proteínas soluble (Bradford, 1976)	80
• A II.4.- Determinación de proteínas. Método Kjeldahl.....	80
A II.5.- Determinación de cenizas.....	82
Anexo III: Curvas de calibración para determinaciones analíticas de materias primas y para fermentación	84
• A III.1.- DNS: azúcares reductores.....	84
• A III.2.- Fenol Sulfúrico: azúcares totales	85
• A III.3.- Bradford: proteína soluble.....	86
Anexo IV: Resultados de las determinaciones analíticas de materias primas y para fermentación	87
Anexo V: Cálculos de las concentraciones empleadas en la CMI contra <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.....	90
Anexo VI: Ajustes mediante regresión no lineal para estimar tasa máxima de crecimiento y velocidad específica de consumo de azúcares totales utilizando el software SigmaPlot 14 (Systat Software Inc., EE. UU.)	94
Anexo VII: Estimación de la $\mu_{\text{máx}}$ y q_s utilizando el software PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 (EE. UU.)	101
Anexo VIII: Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante análisis estadístico en software SPSS v.25.00	113
Anexo VI: Producción científica.	137
9.1.- Referencias bibliográficas.	138

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Matraz inoculado con <i>Enterococcus faecium</i>	23
Figura 2 Separación de biomasa y neutralización de sobrenadante libre de células	24
Figura 3 Determinación del consumo de azúcares por método fenol-sulfúrico a sobrenadantes libres de células de cada tiempo muestreado en la cinética.	24
Figura 4 Determinación de proteínas solubles en SLC concentrados en NanoDrop	27
Figura 5 Determinación de CMI en microplaca.....	27
Figura 6 Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> en MRS (medio estándar comercial), y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey) en condiciones de reposo a 37°C.	31
Figura 7 Perfil de fermentación de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> (g/L) durante 24 h en condiciones de reposo a 37°C en medio MRS (medio estándar comercial), y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).	33
Figura 8 Principales fuentes de carbono en los medios de crecimiento utilizados para <i>Enterococcus faecium</i> : a) glucosa (NEUROtiker, s/f-a), b) lactosa (Yikrazuul, s/f) , c) sacarosa (NEUROtiker, s/f-b) e d) inulina (Timin, s/f).	34
Figura 9 Perfil del consumo de azúcares totales durante la cinética de crecimiento de <i>Enterococcus faecium</i> en condiciones de reposo a 37°C en medio de cultivo MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).....	36
Figura 10 Tasa de crecimiento máxima específica ($\mu_{m\acute{a}x}$) de <i>Enterococcus faecium</i> en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (4)	39
Figura 11 Consumo de azúcares totales (qs) de <i>Enterococcus faecium</i> en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (6).....	39
Figura 12 Proteína soluble obtenida en lecturas a 280 nm en NanoDrop en los sobrenadantes libres de células concentrados en SpeedVac de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h de la cinética con <i>Enterococcus faecium</i>	41
Figura 13 Matraz inoculado con <i>Streptococcus infantarius</i>	53
Figura 14 Concentrados en SpeedVac de SLC para posterior determinación de proteína en NanoDrop.	56
Figura 15 Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> en MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos M1(suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey) en condiciones de reposo a 37°C.	60
Figura 16 Perfil de fermentación de crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> (g/L) durante 24 h en condiciones de reposo a 37°C en medio MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).	61
Figura 17 Perfil del consumo de azúcares totales durante la cinética de crecimiento de <i>Streptococcus infantarius</i> en condiciones de reposo a 37°C en medio de cultivo MRS (medio estándar comercial) y	

medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).....	63
Figura 19 Tasa de crecimiento máxima específica ($\mu_{\text{máx}}$) de <i>Streptococcus infantarius</i> en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (4)	66
Figura 20 Consumo de azúcar total (qs) de <i>Streptococcus infantarius</i> en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (6).....	67
Figura 21 Proteína soluble obtenida en lecturas a 280 nm en NanoDrop en los sobrenadantes libres de células concentrados en SpeedVac de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h de la cinética con <i>Streptococcus infantarius</i>	68
Figura A1 Determinación de azúcares reductores en ingredientes para formular medios de cultivo.	78
Figura A2 Determinación de azúcares totales en ingredientes para formulación de medios de cultivo	79
Figura A3 Determinación de proteína soluble en ingredientes para formulación de medios de cultivo.	80
Figura A4 Determinación de N en ingredientes para formulación de medios	82
Figura A5 Determinación de cenizas en ingredientes para formulación de medios.	83
Figura A6 Curva de calibración de glucosa para la determinación de azúcares reductores.	84
Figura A7 Curva de calibración de lactosa para la determinación de azúcares reductores.	84
Figura A8 Curva de calibración No. 1 de glucosa para la determinación de azúcares totales.	85
Figura A9 Curva de calibración No. 2 de glucosa para la determinación de azúcares totales.	85
Figura A10 Curva de calibración de SAB para la determinación de proteína soluble.	86
Figura A11 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo MRS.....	94
Figura A12 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M1.....	95
Figura A13 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M2.....	95
Figura A14 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo MRS.....	96
Figura A15 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M1.....	96
Figura A16 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M2.....	97
Figura A17 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo MRS.	97
Figura A18 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M1.	98

Figura A19 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M2.	98
Figura A20 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo MRS.	99
Figura A21 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M1.	99
Figura A22 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M2.	100
Figura A23 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo MRS.	101
Figura A24 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M1.	102
Figura A25 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M2.	103
Figura A26 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo MRS.	104
Figura A27 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M1.	105
Figura A28 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M2.	106
Figura A29 Velocidad de consumo máxima $((g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1})$ estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo MRS.	107
Figura A30 Velocidad de consumo máxima $((g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1})$ estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M1.	108
Figura A31 Velocidad de consumo máxima $((g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1})$ estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$ para <i>Enterococcus faecium</i> en medio de cultivo M2.	109
Figura A32 Velocidad de consumo máxima $((g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1})$ estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$ para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo MRS.	110

Figura A33 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$) para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M1.	111
Figura A34 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$) para <i>Streptococcus infantarius</i> en medio de cultivo M2.	112

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones alcanzadas a las 6 h de incubación para los 2 microorganismos indicadores usados (Trejo-González, 2021).	28
Tabla 2 Concentraciones empleadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Enterococcus faecium</i> .	29
Tabla 3 Parámetros obtenidos en cinéticas de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con los distintos medios de cultivo evaluados: MRS como medio control y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).	37
Tabla 4 Concentración mínima inhibitoria encontrada en los controles utilizados y en los sobrenadantes libres de células de <i>Enterococcus faecium</i> obtenidos durante la fermentación los medios MRS, M1 y M2 para los microorganismos patógenos <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	42
Tabla 5 Concentraciones alcanzadas a las 6 h de incubación para los 2 microorganismos indicadores usados (Trejo-González, 2021).	57
Tabla 6 Concentraciones empleadas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de <i>Streptococcus infantarius</i> .	57
Tabla 7 Parámetros obtenidos en cinéticas de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con los distintos medios de cultivo evaluados: MRS como medio control y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).	65
Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria encontrada en los controles utilizados y en los sobrenadantes libres de células de <i>Streptococcus infantarius</i> en los medios MRS, M1 y M2 para los microorganismos patógenos <i>Listeria monocytogenes</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	70
Tabla A1 Resultados de las determinaciones analíticas de ingredientes para la formulación de medio de cultivo.	87
Tabla A2 Resultados de contenido de proteína (% p/p) en ingredientes para formulación de medios.	88
Tabla A3 Resultados de contenido de ceniza (% p/p) en ingredientes para formulación de medios.	89
Tabla A4 Ajustes de la suspensión bacteriana para alcanzar una concentración final en el pozo de 10 ⁵ UFC/mL.	90
Tabla A5 Contenido en los pozos aforados a 220 µL en placa ELISA (Corning® Costar®) según el tratamiento analizado.	93
Tabla A6 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i> .	113
Tabla A7 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio MRS) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i> .	114

Tabla A8 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	115
Tabla A9 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio MRS) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	116
Tabla A10 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	117
Tabla A11 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio MRS) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	118
Tabla A12 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio MRS) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	119
Tabla A13 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio MRS) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	120
Tabla A14 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	121
Tabla A15 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M1) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	122
Tabla A16 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	123
Tabla A17 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M1) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	124
Tabla A18 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	125
Tabla A19 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de	

<i>Streptococcus infantarius</i> con medio M1) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	126
Tabla A20 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	127
Tabla A21 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M1) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	128
Tabla A22 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	129
Tabla A23 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M2) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	130
Tabla A24 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	131
Tabla A25 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Enterococcus faecium</i> con medio M2) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	132
Tabla A26 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	133
Tabla A27 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M2) en la determinación de la CMI VS <i>Listeria monocytogenes</i>	134
Tabla A28 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	135
Tabla A29 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de <i>Streptococcus infantarius</i> con medio M2) en la determinación de la CMI VS <i>Staphylococcus aureus</i>	136

Nomenclatura

°C	Grado Celsius
α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitros
$\mu\text{máx}$	Máxima velocidad específica de crecimiento (h^{-1})
AaM	Actividad antimicrobiana
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection (Colección americana de cultivos)
A.O.A.C.	Association of Analytical Communities (Asociación Científica Dedicada a la Excelencia Analítica)
BAL	Bacteria ácido-láctica
BHI	Brain Heart Infusion (Infusión cerebro corazón)
BLIS	Bacteriocin-like inhibitory substances (sustancia inhibitoria similar a bacteriocina)
C	Carbono
C/N	Relación carbono/nitrógeno
CaCl_2	Cloruro de calcio
CH_2OH	Etanol
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DO	Densidad óptica
EE. UU.	Estados Unidos
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)
EPS	Sustancia polimérica extracelular
exp	Exponencial
FDA	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
g	Gramos
g/L	Relación gramo por litro
GRAS	Generally Recognized as Safe (Generalmente Reconocido como Seguro)
h	Hora
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
H_3BO_3	Ácido bórico
HCl	Ácido clorhídrico
HSD Tukey	Honestly significant difference Tukey (Test de comparaciones múltiples de Tukey)
kDa	Kilodalton
KH_2PO_4	Fosfato dipotásico
<i>L. monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>

M	Molar
M1	Medio de cultivo sugerido que contiene como fuente de carbono alternativa suero de leche y sacarosa
M2	Medio de cultivo sugerido que contiene como fuente de carbono alternativa suero de leche y jarabe de maguey
mg	Miligramos
mg/mL	Relación miligramo por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitros
MnSO₄•H₂O	Monohidrato de sulfato de manganeso
MRS	Medio de cultivo de Man-Rogosa-Sharpe
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
N	Nitrógeno
N	Normal
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NH₃	Amoníaco
Nis	Nisina
nm	Nanómetros
O	Oxígeno
OH	Hidróxido
p/p	Relación peso/peso
p/v	Relación peso/ volumen
PAM	Péptidos antimicrobianos
pH	Potencial de hidrógeno
Pt	Peso del tubo
qs	Consumo de sustrato
R²	Coeficiente de determinación
rDNA	ADN recombinante
rpm	Revoluciones por minuto
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta
S₀	Concentración inicial de sustrato
SAB	Sero Albúmina bovina
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S_f	Concentración final de sustrato
<i>S. infantarius</i>	<i>Streptococcus infantarius</i>
SLC	Sobrenadante libre de células
SPSS v.25.00	Statistical Package for the Social Sciences (Paquete estadístico para las ciencias sociales) versión 25
t	Tiempo
T	Tiempo
TSBYE	Trypticase Soy Broth with 0.6% Yeast Extract (Caldo de soja tripticasa con extracto de levadura 0.6%)

UFC	Unidades formadoras de colonia
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
USA	United States of America
v/v	Relación volumen/volumen
V_m	Volumen de la muestra
x	Biomasa
x₀	Concentración inicial de biomasa
x_{máx}	Máxima biomasa obtenida experimentalmente

Resumen

El presente trabajo examina el uso de los subproductos agroindustriales como parte de la formulación de medios de cultivo económicos para la producción de bacteriocinas, se proponen dos medios de cultivo alternativos (M1 y M2), conteniendo suero, melaza y aguamiel, con diferente relación carbono/nitrógeno, sembrando en ellos a las bacterias *Enterococcus faecium* y *Streptococcus infantarius*. El ajuste de la relación carbono nitrógeno fue realizado por los métodos espectrofotométricos de cuantificación de proteínas por método de Kjeldahl y azúcares totales por método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956); el proceso de fermentación se llevó a cabo en los medios alternativos, así como en medio MRS como control, con un pH ajustado a 7 e incubación de 37 °C a distintos tiempos. El seguimiento de la fermentación se llevó a cabo por determinación de biomasa, la cual, se calculó por diferencia de peso tras centrifugación y secado, a su vez, la presencia de la actividad antimicrobiana y la concentración de azúcares se determinaron en los sobrenadantes, mientras que la eficacia antimicrobiana fue comprobada frente a cepas de *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) cultivadas en caldo BHI, estéril e incubadas por 24 horas a 37°C y la concentración mínima inhibitoria (CMI). Los análisis estadísticos se realizaron con SPSS v.25.00, aplicando la prueba de Tukey para identificar diferencias significativas. Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que *Enterococcus faecium* cultivado en medios MRS, M1, y M2, mostró fases de crecimiento definidas, con la fase exponencial entre las 3 y las 6 horas y la estacionaria a partir de las 9 horas. Aunque el crecimiento fue superior en MRS, los medios alternativos M1 y M2 también permitieron un desarrollo adecuado de la BAL. El pH inicialmente neutro de los medios se acidificó durante la fermentación, alcanzando valores más bajos en MRS en comparación con M1 y M2, lo cual se atribuye a la alta capacidad amortiguadora del suero presente en M1 y M2. La producción de biomasa fue mayor en los medios alternativos que en MRS, destacando un posible efecto de los ingredientes agroindustriales en la mejora del crecimiento bacteriano. El consumo de azúcares no superó el 50% en ninguno de los medios, siendo más eficiente en MRS debido a la presencia de glucosa como fuente principal de carbono, mientras que M1 y M2, con suero de leche, melaza y jarabe de maguey, ofrecieron sacarosa y fructooligosacáridos como fuentes de carbono alternativas. La evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los sobrenadantes libres de células (SLC) frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* reveló una actividad antimicrobiana significativa, especialmente en el medio M2, sugiriendo la producción de sustancias con potencial bioconservador. En fermentaciones realizadas a nivel de laboratorio en condiciones de reposo a 37°C, se demostró que los medios alternativos permitieron el crecimiento de la BAL *Enterococcus faecium* con la producción de sustancias con actividad antimicrobiana, principalmente con actividad anti-listerial, lo que abre la posibilidad de sustitución de medios de cultivo estándar. Este estudio demuestra la viabilidad de utilizar subproductos agroindustriales para la producción de BAL con capacidad antimicrobiana, ofreciendo una alternativa sostenible y eficiente para la industria alimentaria.

La información anterior, permitió realizar el cálculo de los parámetros cinéticos de crecimiento en los 3 medios utilizados: velocidad máxima de crecimiento específico ($\mu_{\text{máx}}$), rendimiento y velocidad de consumo de azúcares totales (qs) donde para *E. faecium* el medio M2 tuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.25 h^{-1} , qs de $2.06 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento final de $0.21 \frac{\text{g biomasa}}{\text{g azúcar total}}$ para esta BAL, ahora bien, para *S. infantarius* el medio M2 tuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.29 h^{-1} , qs de $2.45 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento final de $0.20 \frac{\text{g biomasa}}{\text{g azúcar total}}$, ambos resultados coinciden en un punto, en este medio de cultivo M2 hay una mejor tasa máxima de crecimiento específica y una conversión eficiente de la energía en biomasa dado el rendimiento obtenido, aunque los datos de qs para *E. faecium* fueron los menores y para *S. infantarius* los intermedios, lo cual sugiere una dificultad para hidrolizar los azúcares contenidos en el M2. Estos resultados apuntan a que la actividad antimicrobiana se encuentra favorecida en este medio de cultivo M2 en ambas BAL, ya que se beneficia la producción de biomasa y bacteriocinas, considerando que el crecimiento está asociado con la producción de éstas. Por lo anterior, la optimización de medios de cultivo para las BAL como *Enterococcus faecium* y *Streptococcus infantarius*, mediante la incorporación de suero de leche con melaza o jarabe de maguey, ha demostrado ser eficaz en la producción de biomasa y bacteriocinas, aunado a la sostenibilidad en el diseño de procesos para producirlos. Dichos resultados sugieren un potencial prometedor, pero se requieren estudios adicionales, como la purificación e identificación de posibles bacteriocinas. Además, se sugiere explorar condiciones de fermentación adicionales, abriendo la puerta a futuras investigaciones que puedan mejorar aún más la eficiencia y las aplicaciones prácticas de estos bioconservadores.

Abstract

This work examines the use of agro-industrial by-products to formulate economic culture media for bacteriocin production; two alternative culture media (M1 and M2) are proposed, containing whey, molasses and agave syrup, with different carbon/nitrogen ratios, sowing in them the lactic acid bacteria (LAB) *Enterococcus faecium* and *Streptococcus infantarius*. The adjustment of the carbon-nitrogen ratio was made considering ingredient analyses by the spectrophotometric methods of quantification of proteins by Kjeldahl method and total sugars by phenol-sulfuric method (Dubois et al., 1956); the fermentation processes were carried out in alternative media, as well as in MRS medium as control, with pH adjusted to 7 and incubation of 37 °C at different times. The monitored variables included biomass concentration, which was calculated by weight difference after centrifugation and drying; the antimicrobial activity and sugar concentration were determined in the supernatants. The antimicrobial efficacy was tested against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923) cultivated in BHI for 24 hours at 37°C, determining the minimum inhibitory concentration (MIC). Statistical analyses were performed with SPSS v.25.00, applying the Tukey test to identify significant differences. The results obtained in this study show that *Enterococcus faecium*, cultivated in media MRS, M1, and M2, showed defined growth phases, with the exponential phase between 3 and 6 h and the stationary one from 9 h. Although the growth was higher in MRS, the alternative media M1 and M2 also allowed for the proper LAB development. The initially neutral pH of the media was acidified during fermentation, reaching lower values in MRS compared to M1 and M2, which is attributed to the high buffering capacity of the serum present in M1 and M2. Biomass production was higher in alternative media than in MRS, highlighting a possible effect of agro-industrial ingredients on improving bacterial growth. Sugar consumption did not exceed 50% in any of the media, being more efficient in MRS due to the presence of glucose as the main source of carbon, while M1 and M2, with whey, molasses and agave syrup, offered sucrose and fructooligosaccharides as alternative carbon sources. The MIC evaluation of cell-free supernatants (CFS) against *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* revealed significant antimicrobial activity, especially in the M2 environment, suggesting the production of substances with potential as preservatives. In fermentations under resting conditions at 37°C, it was demonstrated that alternative media allowed the growth of the *Enterococcus faecium* with the production of substances with antimicrobial activity, mainly with antilisterial, which opens the possibility of replacing standard culture media. This study demonstrates the feasibility of using agro-industrial by-products to produce LAB with antimicrobial capacity, offering a sustainable and efficient alternative for the food industry.

The kinetic parameters determined were maximum specific growth rate ($\mu_{\max}$), yield and total sugar consumption rate (q_s), where for *E. faecium*, M2 medium had a $\mu_{\max}$ of 1.25 h^{-1} , q_s of $2.06 \frac{\text{g total sugar}}{\text{g biomass}} \cdot \text{h}^{-1}$ and a final yield of $0.21 \frac{\text{g biomass}}{\text{g total sugar}}$; for *S. infantarius*, M2 medium

had a $\mu_{\text{máx}}$ of 1.29 h^{-1} , q_s of $2.45 \frac{\text{g total sugar}}{\text{g biomass}} \cdot \text{h}^{-1}$ and a final yield of $0.20 \frac{\text{g biomass}}{\text{g total sugar}}$. Medium M2 provides LAB efficient energy conversion into biomass given the yield obtained, although the data of q_s for *E. faecium* were minor and for *S. infantarius* the intermediate, which suggests a difficulty to hydrolyse the sugars contained in M2. These results suggest that antimicrobial activity is favoured in the M2 culture medium for both LAB, as it benefits the production of biomass and bacteriocins. Therefore, the optimization of culture media for LAB production, such as *Enterococcus faecium* and *Streptococcus infantarius*, by the incorporation of whey with molasses or maguey syrup, has proven to be effective in the production of biomass and antimicrobial activity, together with sustainability in the design of processes to produce them. These results suggest promising potential, but additional studies are needed, such as the purification of bacteriocins from the cell-free supernatants. Also, additional fermentation conditions for these LABs need to be explored, opening the door to future research that could further improve the efficiency and applications of these biopreservatives.

1.- Introducción

Actualmente los consumidores han generado gran demanda en alimentos mínimamente procesados y con la menor cantidad de aditivos y compuestos químicos, que conserven sus cualidades sensoriales y principalmente estén libres de microorganismos patógenos (Kumari et al., 2022). En este sentido hay un creciente interés en el uso de bacteriocinas en la industria de los alimentos como una alternativa de conservación, por sus cualidades bactericidas y bacteriostáticas contra los microorganismos deterioradores y patógenos que puedan estar presentes en los alimentos, pero sobre todo por no ser tóxicas para el consumo humano, tener estabilidad en el procesamiento y almacenamiento en los alimentos. Por lo anterior, la industria alimentaria continua en la búsqueda de nuevas sustancias antimicrobianas como las BLIS (bacteriocin-like inhibitory substances), bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) y nuevos microorganismos productores de éstas (principalmente las bacterias ácido-lácticas, BAL). Así como la búsqueda del mejoramiento en los procesos de fermentación para la producción de bacteriocinas donde están involucrados aspectos relacionados a las condiciones de operación y formulación de los medios de cultivo, entre otros. A nivel laboratorio, se utilizan medios de cultivo como De Man-Rogosa-Sharpe (MRS) para el crecimiento de cepas productoras de bacteriocinas, especialmente por BAL, sin embargo, a gran escala el uso de estos medios de cultivo es muy caro, debido al volumen de medio requerido, los rendimientos de los péptidos antimicrobianos y la purificación de estos. Por tanto, se buscan medios de cultivo más económicos que proporcionen la cantidad adecuada de nutrientes, tales como carbohidratos, minerales, vitaminas, aminoácidos, proteínas, entre otros, sin los costos elevados que tiene el emplear medios de cultivo comerciales (Aguilar-Galvez et al., 2011; Lasik-Kurdyś & Sip, 2018; Trejo-González et al., 2021).

Hoy en día, las agroindustrias generan residuos que son una fuente importante de contaminación sino son tratados de manera adecuada, por ello el procesamiento biológico de subproductos de la industria láctea y alimentaria puede ser considerado como una de las alternativas rentables de aprovechamiento, generando bioproductos de alto valor y estimulando investigaciones para el aprovechamiento de los mismos (Garsa et al., 2013).

Por lo anterior, en este trabajo se plantea el uso de subproductos tales como lactosuero y melaza, además del uso de aguamiel de maguey como ingrediente importante (i.e. fuente de carbono) para la formulación de medios de cultivos alternos para la producción de sustancias con actividad antimicrobiana a partir de BAL como *Enterococcus faecium* y/o *Streptococcus infantarius*, aisladas queso Cotija y del Pozol, respectivamente, considerados alimentos artesanales, todo lo anterior a nivel matraz.

2.- Capítulo I

Perspectivas de las bacterias ácido lácticas:

Producción, péptidos antimicrobianos, bacteriocinas, probióticos y aplicación.

2.1.- Alimentos fermentados artesanales

La importancia que tienen los productos fermentados se debe al papel que juegan en la dieta, son una fuente de nutrientes de bajo costo y de ingresos para quienes se dedican a su producción. Tienen una gran importancia cultural debido a que las técnicas de fermentación tradicionales son transmitidas de generación en generación. Por lo anterior, los consumidores han preferido alimentos durante miles de años tanto por la mayor vida útil, el sabor y estructura que el producto final obtiene (Hajikhani et al., 2021; Obioha et al., 2021).

Desde hace siglos se han reportado distintos procesos para la producción de alimentos tradicionales para consumo humano y animal. Los distintos tipos de alimentos fermentados de manera tradicional, se consideran una fuente importante en el desarrollo de nuevas cepas con diversa actividad antimicrobiana (Lozo et al., 2021).

Ahora existe un creciente interés por la obtención de productos alimentarios seguros. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta que las enfermedades transmitidas por los alimentos provocan alrededor de 600 millones de infecciones y 420 000 muertes al año a nivel mundial (ONU, 2022). Aunado que las tendencias de los consumidores actualmente se han desplazado hacia los alimentos conservados con compuestos naturales en combinación con otros métodos de procesamiento novedosos para inactivar o retardar microorganismos indeseables (Popa et al., 2023; Rathod et al., 2022).

2.2.- Bacterias ácido lácticas en la elaboración de alimentos fermentados

La aplicación de microorganismos y sus metabolitos para la conservación de los alimentos es conocida como bioconservación, que es un campo emergente que tiene aplicaciones en todo el sector alimentario para el procesamiento y conservación de alimentos. Ahora bien, para que un microorganismo o sus metabolitos sean calificados como bioconservadores, estos deben tener un amplio espectro antimicrobiano contra los microorganismos patógenos y causantes de deterioro, esto considerando que además deben ser seguros para los consumidores. Agregando, además que deben ser estables en diversas condiciones de procesamiento y no deben alterar las propiedades sensoriales de los alimentos (Rathod et al., 2022).

Las BAL son un grupo diverso pero clave de microorganismos, que al paso del tiempo han proporcionado beneficios al ser humano, entre las características que comparten estas bacterias se encuentran: Gram positivas, catalasas negativas, no forman esporas y son anaeróbicas, además de que como producto final de la fermentación producen el ácido láctico. Pertenecen a esta categoría miembros importantes como los géneros: *Lactobacillus*,

Paralactobacillus, *Holzappelia*, *Amylolactobacillus*, *Bombilactobacillus*, *Companilactobacillus*, *Lapidilactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, entre otros más (Trejo-González et al., 2021). Es importante mencionar, que algunas especies de BAL tienen capacidad para producir enzimas específicas, exopolisacáridos, bacteriocinas, edulcorantes, polisacáridos y compuestos aromáticos que conllevan a que el alimento fermentado tenga un perfil sensorial agradable. Asimismo, algunas también poseen propiedades probióticas y capacidad para producir péptidos antimicrobianos como las ya mencionadas bacteriocinas (Kumari et al., 2021).

Las BAL son reconocidas por la FDA (Food and Drug Administration) como microorganismos generalmente considerados seguros (GRAS), ya que se utilizan no solo para producir alimentos fermentados, sino además, una amplia variedad de aditivos alimentarios y compuestos aromáticos (De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2018).

En la literatura se reportan varias técnicas “estándar” utilizadas para el aislamiento de las BAL y su caracterización: para su crecimiento se reporta el uso de medios de cultivo como MRS y M17; kits comerciales como API 50 CHL y API 20 Strept y prueba de catalasa para cuestiones del perfil bioquímico; la tinción Gram y secuenciación del gen 16s rDNA (Trejo-González et al., 2021).

Las bacterias que se añaden a las materias primas para la obtención de alimentos fermentados, pueden ser clasificadas en función del propósito principal con el que se hace: I) Como cultivos iniciadores que son adicionados para inducir cambios en cuanto a textura, aroma, sabor, color y digestibilidad de las materias primas, para la obtención de productos finales con características sensoriales y reológicas deseables; II) como cultivos protectores, que son añadidos para garantizar la calidad higiénico-sanitaria de los alimentos, además de incrementar la vida útil mediante la inhibición de microorganismos patógenos y alterantes que pudieran estar presentes en los alimentos; III) como cultivos adjuntos, que se adicionan con un propósito distinto a los anteriormente mencionados, como por ejemplo, para acelerar la maduración mediante lisis celular de los cultivos iniciadores durante la elaboración de determinados tipos de quesos, la producción del sabor y aroma deseados o bien, el aporte de beneficios adicionales a la salud del consumidor (ejemplo de ello, propiedades probióticas y producción de péptidos bioactivos) (Campanero-Pintado, 2018).

Las BAL han sido ampliamente investigadas por sus características antimicrobianas que se relacionan con la liberación de metabolitos secundarios y compuestos producidos, que muestran un efecto conservante. Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos que se producen en el citoplasma y son exportadas fuera de las células por microorganismos (grampositivos y gramnegativos), que restringen el crecimiento de los microorganismos no deseados, como ejemplo, están la nisina, pediocina y reuterina. También se informa de la

capacidad de mejorar la calidad de los alimentos cuando son aplicadas, además de los efectos antimicrobianos (Rathod et al., 2022).

El uso eficaz de bacteriocinas en la industria alimentaria como factor de seguridad alimentaria puede estar asociado con la extensión de la vida útil y la protección contra patógenos transmitidos por los alimentos, especialmente en el caso de alimentos no refrigerados. Como resultado, se reduce significativamente el riesgo de transferir patógenos y organismos de descomposición a estos productos. Además de reducir la cantidad de patógenos transmitidos por los alimentos, las bacteriocinas también reducen significativamente las pérdidas económicas asociadas con el deterioro de los alimentos, los brotes de enfermedades y las retiradas de productos. Es importante señalar que las bacteriocinas se consideran agentes antimicrobianos naturales y, por lo tanto, satisfacen a creciente demanda de los consumidores de un menor uso de conservantes y procesamiento químico, así como la creciente tendencia hacia alimentos más naturales (Todorov et al., 2022).

2.2.1.- Microorganismos patógenos relacionados con alimentos:

- *Listeria monocytogenes* (Lm)

Las especies de *Listeria* son bacilos Gram-positivos ubicuos que se encuentran en diferentes nichos ambientales. Entre las especies del género *Listeria*, *Listeria monocytogenes* es patógena; transmitido por los alimentos a humanos, que causa listeriosis y se asocia con otras dolencias humanas como bacteriemia, encefalitis y sepsis. Es un patógeno psicotolerante, capaz de crecer a diferentes temperaturas (1-45°C), pero la temperatura óptima oscila entre 30 y 37°C. Entre los principales vehículos de transmisión de infecciones humanas por *Listeria* se encuentran los alimentos contaminados, a menudo aquellos que están listos para el consumo. *Listeria* es un parásito bacteriano intracelular que causa aproximadamente 1600 enfermedades y 260 muertes cada año en los Estados Unidos de América. Debido a la alta tasa de mortalidad asociada con la listeriosis y su dosis infecciosa indeterminada, la FDA ha establecido una tolerancia cero para *Listeria* en los alimentos. En comparación con otros patógenos transmitidos por los alimentos que infectan principalmente el tracto gastrointestinal, *Listeria* es capaz de penetrar las barreras hematoencefálica y placentaria, lo que aumenta la gravedad de la enfermedad. Las personas con mayor riesgo de contraer *Listeria* son las mujeres embarazadas, los ancianos, los bebés y las personas inmunodeprimidas (Matereke & Okoh, 2020; Sibanda & Buys, 2022; Townsend et al., 2021).

- *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) es una bacteria grampositiva y es una de las principales causas de muchas enfermedades infecciosas tanto en humanos como en animales. Estas enfermedades van desde infecciones superficiales de la piel y los tejidos blandos hasta afecciones más graves y potencialmente mortales, como infecciones de la sangre. Esta bacteria se encuentra en la microbiota cutánea típica de animales y humanos, y su tasa de

transporte es del 20 % al 30 % en personas sanas. *S.aureus* secreta una sustancia polimérica extracelular (EPS) que forma una biopelícula, que ayuda al microbio a resistir los medicamentos antibacterianos y reduce su efecto. Hay cepas resistentes a la metilina (MRSA), donde la patogenicidad de *S.aureus* se ha convertido en un problema tanto en los entornos comunitarios como en las instituciones de salud. Además, desarrolla una resistencia rápida a los antibióticos, donde la proliferación de formas multirresistentes es un problema significativo. Se ha informado que las enfermedades resistentes a los antibióticos han superado los 10 millones de muertes anuales y que en 2050 superarán en número las muertes por cáncer (Ahmad-Mansour et al., 2021; Idrees et al., 2021). En contraste con muchos otros patógenos bacterianos, que con frecuencia dependen de una o pocas toxinas para causar la enfermedad, *S.aureus* produce una amplia gama de factores virulentos. Estos incluyen una gran cantidad de factores de evasión inmunitaria y toxinas, así como una variedad de factores proteicos y no proteicos que permiten que el huésped se colonice durante la infección. La virulencia de *S.aureus* ha sido un tema de gran interés, desde que esta bacteria fue identificada como un patógeno importante a finales del siglo XIX, los esfuerzos de investigación para desentrañar los mecanismos de virulencia de *S.aureus* han ido en aumento (Cheung et al., 2021).

2.3.- Péptidos antimicrobianos

Los péptidos antimicrobianos (PAM) son péptidos pequeños con carga positiva que son encontrados en diversos organismos, desde microorganismos hasta humanos. La mayoría tienen capacidad de matar patógenos microbianos de forma directa, aunque muchos de ellos manipulan los sistemas de defensa del microorganismo huésped de manera indirecta (Modiri et al., 2021). Tienen diversos atributos en cuanto a sus mecanismos de destrucción que les otorga cierta toxicidad selectiva sea contra bacterias, hongos, virus y parásitos. Además, poseen actividades bactericidas que emplean distintos mecanismos de destrucción entre los que se encuentran la formación de poros en la membrana, la inhibición de la biosíntesis de la pared celular y la inactivación de ácidos nucleicos o proteínas. Son únicos en cuanto a características discriminatorias específicas y propiedades multidimensionales como flexibilidad, la sinergia con la que actúan con varios antibióticos y fármacos convencionales, la neutralización de endotoxinas con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) bajas, inhibición o erradicación de biopelículas establecidas, antivirales, las propiedades anticancerígenas, además del amplio espectro de microbios resistentes a múltiples fármacos, la inmunomodulación, entre otros. Propiedades tan valiosas los convierten en puntos clave de explotación. Por ello, numerosos estudios validan sus aplicaciones en medicina, agricultura, ganadería, acuicultura y bioconservación entre otras (Joo, 2018; Sudha & Aranganathan, 2021).

2.4.- Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos antimicrobianos pequeños, catiónicos, anfifílicos que varían en espectro y modo de acción, estructura y masa molecular, termoestabilidad, rango de pH de actividad y determinantes genéticos. Están conformadas entre 20 a 60 aminoácidos los cuales les confieren sus principales propiedades que son: tolerancia a los ácidos, termoestabilidad y la especificidad bactericida (Aguilar-Galvez et al., 2011; De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2018), como se menciona anteriormente. Son sintetizados ribosómicamente, se pueden degradar mediante enzimas proteolíticas y son seguras para el consumo humano. Estos péptidos activos son conocidos como metabolitos antimicrobianos primarios en contraste con los antibióticos derivados de microorganismo, muestran un modo de acción bactericida mediante el cual actúan sobre la membrana citoplasmática y, por tanto, sin una resistencia cruzada a los antibióticos. Además, son activos contra bacterias estrechamente relacionadas al nicho ecológico del que deriva la cepa productora (Arumugam et al., 2018; Fugaban et al., 2021; Lozo et al., 2021).

Las bacteriocinas son consideradas multifuncionales, dado que además de la actividad antimicrobiana que resalta como característica común, pueden desempeñar otro tipo de funciones en las células con potenciales aplicaciones que incluyen terapias antivirales y anticancerígenas, por mencionar algunas. Los datos disponibles sobre bacteriocinas que hay en la naturaleza sugieren que un 99% del total de bacterias son productoras de al menos un tipo de bacteriocina, donde muchas de ellas permanecen aún sin ser descubiertas. Actualmente, de acuerdo con los datos de bases que refieren a las bacteriocinas de calidad mundial se indica que el *Antimicrobial Peptide Database* (APD, por sus siglas en inglés) (Dept of Pathology & Microbiology, 2023) se mantienen registrados un total de 3569 péptidos antimicrobianos de los seis reinos biológicos existentes (380 bacteriocinas/antibióticos peptídicos aislados/predichos de bacterias). Aunque *Bactibase* (BACTIBASE, s. f.) no se ha actualizado desde 2017, es una base datos de bacteriocinas, y la información que proporciona es valiosa y nos da una perspectiva real de la ciencia de las bacteriocinas, porque la mayoría de las bacteriocinas descubiertas son de cepas Gram positivas donde 206 pertenecen a este grupo y 19 a las cepas Gram negativas. En este sentido, el género de bacteriocinas Gram positivas más comúnmente reportado es *Lactobacillus*, seguido de *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y el género *Bacillus*. Respecto a las bacteriocinas de origen Gram negativas, el género reportado con mayor frecuencia es *Escherichia*. (Benítez-Chao, 2021; de Freire Bastos et al., 2020)

Por otro lado, las bacteriocinas se clasifican de acuerdo con su composición de aminoácidos, estructura química, complejidad y pasos involucrados en su producción. Actualmente la clasificación de bacteriocinas se divide en cuatro clases: clase I- péptidos pequeños modificados postraduccionalmente y que son sintetizados ribosómicamente; clase II-

péptidos no modificados y de hasta 10 kDa; Clase III – proteínas grandes; Clase IV- proteínas circulares. Dentro de esta clasificación se encuentran las representantes más estudiadas como las producidas por los géneros *Lactococcus* y *Lactobacillus*, donde también se consideran a las bacteriocinas de *Enterococcus*. Además, esta clasificación considera a las bacteriocinas sintetizadas por microorganismos Gram-negativos como *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Klebsiella* (Lozo et al., 2021).

La biosíntesis de la bacteriocina está codificada por un grupo de genes cuyo número puede variar. Además, la producción para una bacteriocina puede estar sujeta a una regulación. En este sentido, la mayoría de las bacteriocinas que son reguladas, su regulación es lograda transcripcionalmente mediante mecanismos de detección de quórum (QS), la histidina quinada y el regulador de respuesta, de los cuales dos componentes de este sistema regulador están frecuentemente codificados por el grupo de genes de bacteriocina (de Freire Bastos et al., 2020).

Actualmente, lo que respecta a las bacteriocinas que son producidas por BAL se perciben como conservadores naturales deseables para alimentos. Esto dado, a que la mayoría de BAL se les ha otorgado una presunción calificada de seguridad y las bacteriocinas producidas por estas bacterias pueden servir como alternativas a los conservadores químicos usados en alimentos (Lasik-Kurdyś & Sip, 2018). Las bacteriocinas o cultivos de BAL que producen bacteriocinas pueden ofrecer una barrera adicional para el control del crecimiento de patógenos Gram-positivos transmitidos por los alimentos, tal es el caso de *Listeria monocytogenes*, durante el proceso de elaboración de quesos frescos (Alvarado et al., 2005).

El término “sustancia inhibitoria similar a la bacteriocina” (BLIS, por sus siglas en inglés) es recomendado para aquellas bacteriocinas que no están caracterizadas en términos de composición de aminoácidos y secuencias de nucleótidos del gen correspondiente (De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2018). Dichas sustancias actúan como antagonistas, teniendo cierta actividad bactericida o bacteriostática frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo inocuas para la cepa productora (De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2019).

2.5.- Factores que afectan la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas

El crecimiento y el metabolismo de las cepas productoras de bacteriocina son afectados por factores como la fuente de carbono y de nitrógeno, la temperatura, el pH y el oxígeno. Los sustratos son diluidos debido a que una concentración excesiva del sustrato natural puede conducir al aumento de la presión osmótica que provocara que se cambien o destruyan la capacidad de las cepas para poder transportar y metabolizar cada componente. A medida que la fermentación progresa, hay una acumulación de ácidos orgánicos que pueden aumentar la acidez del medio de fermentación. Esto a su vez, deriva en que cambios bruscos del pH afectan el metabolismo de los carbohidratos de las cepas, dado a que a mayor acidez se afecta la

función normal de los componentes relacionados con el metabolismo celular, como las proteínas de transporte y las proteínas de la vía de la señal. La importancia en el crecimiento de las cepas que producen bacteriocinas radica en que éstas son producidas desde la fase exponencial media hasta la fase estacionaria temprana donde alcanza un nivel máximo, por tanto, son metabolitos asociados al crecimiento microbiano. El rendimiento de las bacteriocinas por unidad de biomasa es afectado por factores condicionantes del crecimiento como lo son el pH, la temperatura, la agitación y la aireación. También depende fuertemente de la composición y concentración del medio de cultivo (fuentes de carbohidratos y nitrógeno, cationes y aniones, entre otros). Con lo anterior, la optimización de medios de cultivo y condiciones de operación para la producción de bacteriocinas y la mejora de su actividad inhibitoria frente a un riesgo de contaminantes alimentarios es de una gran importancia económica (Aguilar-Galvez et al., 2011; Benmouna & Karam, 2018; Qiao et al., 2019; Wang et al., 2021).

En lo que respecta al requerimiento de nutriente, las BAL se distinguen por ser microorganismos exigentes. Ante esto, los medios de cultivo estándares usados para cultivarlas como lo son el medio De Man-Rogosa-Sharpe (MRS), levadura autolisada-peptona-triptona, -Tween 80-glucosa (LAPTg), si se quisieran aplicar a la industria, no serían redituables por su elevado costo. Debido a que la materia prima es considerada uno de los factores de costo más importantes para la obtención de biomoléculas por fermentación, la composición del medio de cultivo a emplear debe ser definida de manera cuidadosa (De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2018; Juárez-Tomás et al., 2010). Usualmente, después de la detección inicial de las cepas productoras de bacteriocinas, la siguiente etapa es la optimización de las condiciones de cultivo. Por ello, se busca reducir el costo de los medios de cultivo empleados para la producción de biomasa y metabolitos a nivel industrial, se pretende lograrlo mediante una disminución de concentraciones de nutrientes al mínimo indispensable o sustituyendo por componentes de un costo mucho menor. Se estima que son factores condicionantes del crecimiento y que afectan el rendimiento de bacteriocina por unidad de biomasa la temperatura, el pH, la agitación y la aireación. Por lo general, un medio complejo contiene fuentes ricas en nitrógeno que son óptimas para el aumento de la producción de mayor cantidad de bacteriocinas. El establecimiento de las condiciones óptimas para el crecimiento de los microorganismos es una práctica habitual y ampliamente ejercida en los campos relacionados a la microbiología de los alimentos. Sin embargo, existe evidencia respecto a que las cepas seleccionadas como bacteriocinógenas en el medio MRS no producen bacteriocinas cuando se cultivan en medios basados en sustratos más económicos, esto dado a que la síntesis de las bacteriocinas depende en una gran medida de las condiciones de crecimiento de la cepa productora (Aguilar-Galvez et al., 2011; Garmasheva & Oleschenko, 2023; Juárez-Tomás et al., 2010).

2.6.- Fuentes de carbono y nitrógeno para la producción de bacteriocinas

Hay dos factores que son determinantes en los costos comerciales de las bacteriocinas y por ello, en una futura aplicación a escala industrial: la fuente de carbono empleada para el crecimiento de los microorganismos productores de bacteriocinas y los métodos de purificación de las mismas (Schirru et al., 2013).

En este sentido, es imprescindible seleccionar fuentes de carbono y nitrógeno para mejorar condiciones en el proceso y con ello, proporcionar un abastecimiento apto a las células para realizar su biosíntesis y la generación de energía, con esto se busca conseguir un mejor rendimiento y un producto idóneo (De Souza De Oliveira Azevedo et al., 2018). De acuerdo con lo reportado por Abo-Amer, (2010) en una prueba de diez fuentes de carbono: sacarosa, glucosa y lactosa fueron fuentes de carbono adecuadas para el crecimiento bacteriano; sin embargo, lactosa produjo entre siete y seis veces más bacteriocina que sacarosa y glucosa, respectivamente. La galactosa y la rafinosa dieron como resultado buen crecimiento, pero bajos niveles de producción de bacteriocinas. Su crecimiento y producción de bacteriocinas a menudo están limitados por fuentes de nitrógeno orgánico más que por sustratos de carbono (Turgis et al., 2016).

2.7.- Incidencia de las fuentes minerales y vitaminas en la producción de bacteriocinas

En un trabajo realizado por Abo-Amer, (2010) se reporta que la incorporación de NH_4PO_4 , KH_2PO_4 y CaCl_2 en un medio de cultivo para la producción de bacteriocinas, resulta en una impresionante supresión para la producción de las mismas. Sin embargo, al adicionar $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ resultó en un aumento significativo de su rendimiento. Esto debido a que el manganeso es un factor de crecimiento esencial al menos para *Lactobacillus acidophilus*, como para otras BAL, a causa de su papel como constituyente de importantes enzimas implicadas en la hidrólisis de la glucosa. El manganeso también es un constituyente de enzimas clave o respuesta al estrés oxidativo (por ejemplo, superóxido dismutasa) en BAL. El estrés oxidativo puede causar varios tipos de daños a las células bacterianas, incluidas alteraciones de sus rutas metabólicas, mutaciones espontáneas y efectos bacteriostáticos y bactericidas. En este mismo reporte, se concluye que la suplementación del medio con vitaminas adicionales inhibía la actividad de bacteriocina total detectable en el cultivo (Abo-Amer, 2010).

2.8.- Efectos del pH en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas

El pH óptimo para la producción de bacteriocinas suele ser más bajo que el pH óptimo para el crecimiento de la cepa bacteriana (Abo-Amer, 2010). Dado que la producción específica máxima se ha registrado principalmente en el rango de pH de 4.5 a 5.5. Además, la mayoría de los compuestos inhibidores son inestables por encima del pH neutro, con algunas excepciones, pudiendo verse afectadas por fluctuaciones de pH, ya que interfieren con la

integridad de la estructura, lo que dificultaría su posterior actividad. Este comportamiento se atribuye a su alto contenido en glicina y a la formación, a nivel molecular de estructuras globulares y fuertes interacciones hidrofóbicas en la molécula de bacteriocina (Belgacem et al., 2012; Fugaban et al., 2021).

2.9.- Efecto de la temperatura en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas

La temperatura suele tener una influencia considerable en la producción de bacteriocinas (Bizani & Brandelli, 2004). En un estudio sobre la influencia de la temperatura en el crecimiento y producción de bacteriocinas a 25 °C, 30 °C y 37 °C, se observó como esta tiene un fuerte influjo en la producción de la bacteriocina, la cual fue mayor a 30 °C que a 25 °C. Observándose una disminución significativa de la actividad de la bacteriocina a 37 °C. La relación entre el crecimiento y las tasas específicas de producción, en función de la temperatura, mostró diferentes cinéticas de producción y hubo varios picos en las tasas específicas de producción durante el crecimiento. La bacteriocina se produjo en la fase estacionaria, lo que indica que se sintetiza como un metabolito secundario (Bizani & Brandelli, 2004).

2.10.- Efecto de la aireación en la fermentación de BAL para la producción de bacteriocinas

Las BAL son anaerobios facultativos; que significa que son capaces de modificar parte de sus rutas metabólicas en presencia y/o ausencia de oxígeno en el medio de cultivo, lo que les permite ser clasificadas como homolácticas y heterolácticas. Dentro de la primer clasificación (típicamente *Lactococcus*), el ácido láctico es el único producto final de la fermentación; en la segunda clasificación, el ácido láctico aparece junto, en aerobiosis, de distintas porciones de varios metabolitos oxidados (ácido acético, diacetilo, acetoína, etanol, 2,3-butanodiol) (Vázquez et al., 2005).

En un estudio realizado al cultivo de ocho cepas de bacterias ácido-lácticas (Vázquez et al., 2005) se destacó la existencia de tres tipos de comportamientos a diferentes cargas en el medio de cultivo dentro de un rango determinado por la disponibilidad de oxígeno, donde estos comportamientos afectaron la producción de bacteriocinas.

2.11.- Residuos agroindustriales

Durante el procesamiento primario y secundario de la cadena de suministro de alimentos, se generan desperdicios inevitables. La generación de estos difiere según el producto y país en cuestión, dada una serie de factores que se dan a lo largo de la cadena de suministro. En general, países en desarrollo, como países africanos, son ejemplo de países que sufren pérdidas mayores durante la primera etapa del procesamiento primario, correspondiendo alrededor del 75% de pérdidas de alimentos durante la producción y postcosecha. En los países más industrializados, el desperdicio suele ocurrir principalmente en la etapa de

consumo, que representa el 50% de pérdida total de cultivos, esto dado en algunos países de América del Norte, Europa y Oceanía (Zuin & Ramin, 2018).

Ante el panorama actual de una reducción de contaminantes al medio ambiente y también en la búsqueda y necesidad de maximizar la rentabilidad de las materias primas se ha fomentado generar nuevas maneras de utilizar los residuos de la industria alimentaria y de la industria láctea como base de medios de cultivo. Ejemplo de posibles alternativas engloban subproductos como el suero de leche y desechos del procesamiento de mejillones. Dada que la característica más importante que deben tener estos sustratos es su contenido en péptidos que pueden actuar como inductores o precursores de la biosíntesis de péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas. Además de que estos subproductos son una rica fuente de nutrientes como azúcares y proteínas; por lo que ya han sido utilizados como parte de medios de cultivo adecuados para la producción de nisina y pediocina, y lactocina 705 (Garsa et al., 2013).

Los subproductos generados de la industria láctea y alimentaria pueden ser considerados como una de las alternativas rentables de aprovechamiento para el procesamiento biológico, que generaría bioproductos de alto valor y estimulando investigaciones para su aprovechamiento (Garsa et al., 2013). La literatura menciona, además, los residuos ricos en almidón y lignocelulósicos, dado que también son abundantes y económicos, considerando investigaciones que las creen que pueden tener una prometedora influencia como biomasa renovable para la conversión en combustibles, polímeros, enzimas y productos químicos a granel. Lo anterior, da pauta a investigaciones para el uso de fuentes de carbono baratas, especialmente las que se generan a partir de procesos industriales o agrícolas, pudiendo proporcionar una forma de reducción en costos para la producción de bacteriocinas (Schirru et al., 2013)

2.12.- Escalamiento del proceso de producción

Para expandir un proceso de fermentación partiendo de un cultivo a menor escala, es importante y necesario analizar los parámetros operativos y de producción para implementar un bioproceso a una escala mayor, dada la complejidad del procedimiento para integrar todas las condiciones optimizadas (Duman-Özdamar et al., 2021). Es por ello, que para la producción de bacteriocinas depende en gran medida de la composición del medio y de las condiciones del cultivo. Generalmente, son producidas en medios de cultivo complejos incluidos De Man-Rogosa-Sharpe (MRS), extracto de glucosa triptona (TGE), agar para todo uso (APT), infusión cerebro corazón (BHI) y caldo de soya tripticaseína con 0.6% de extracto de levadura (TSBYE) (Khalili-Samani et al., 2021; Yang et al., 2018). Ante este panorama, se considera una desventaja principal para los péptidos antimicrobianos el proceso de producción de estos debido al elevado costo. Aunque las bacteriocinas superan relativamente

este inconveniente, ya que pueden ser producidas por fermentación a gran escala. Dado, que la producción está ligada con el crecimiento de la biomasa bacteriana, el aumento de la densidad celular es una estrategia viable para mejorar la producción de las bacteriocinas (Modiri et al., 2021). Es indispensable ante esto, determinar las condiciones adecuadas de cada organismos para la producción industrial del producto final de interés (Aguilar-Galvez et al., 2011).

2.13.- Aplicación

Las aplicaciones potenciales de bacteriocinas incluyen terapias antibacterianas, antivirales, antiparasitarias y anticancerígenas, alivio del dolor y regulación del calcio intracelular, y sus cepas productoras también podrían usarse como fuente de antibióticos. Son uno de los grupos de metabolitos más prometedores para su uso como agentes antimicrobianos en entornos clínicos, bioconservación de alimentos y agricultura (de Freire Bastos et al., 2020).

Actualmente existe una gran demanda de nuevos compuestos con actividad antimicrobiana, las bacteriocinas y las BLIS son herramientas prometedoras contras los microorganismos potenciales tanto en la industria alimentaria como también en el control de enfermedades infecciosas. Dado al amplio espectro que ofrecen las bacteriocinas solas o en combinación, proporcionan poderosas alternativas para combatir un número importante de organismos diana (De Farias et al., 2021; López-Cuellar et al., 2016).

Las bacteriocinas son consideradas como posibles aditivos para los alimentos, con el propósito de prevenir el deterioro de los alimentos y extender la vida útil sin cambiar el sabor y valor nutricional. Algunos estudios, demuestran que BAL productoras de bacteriocinas podrían aplicarse en los alimentos como un iniciador seguro, pero deben estar libres de factores de virulencia como proteínas de sustancia de agregación, gelatinasa, citolisina, proteínas de superficie enterocócica hialuronidasa, factores accesorios de colonización y antígenos de endocarditis. En la actualidad, se está considerando el papel de las bacteriocinas como una de las características probióticas en las cepas utilizadas para la producción de los denominados alimentos funcionales. Por lo cual, se debe tener una garantía en cuanto a la seguridad de los *Enterococos*, por ejemplo, antes de utilizar estas bacterias como probióticos o cultivos iniciadores en la industria alimentaria o biofarmacéutica (Bağcı et al., 2019; El-Ghaish et al., 2015; Lozo et al., 2021).

2.14.- Bacteriocinas en el mercado mundial

Actualmente hay un interés creciente por las bacteriocinas, que junto a nuevas políticas y regulaciones en los mercados internacionales sobre alimentos y productos médicos, ha cambiado las perspectivas de la industria en el mundo (López-Cuellar et al., 2016). El consumo de alimentos preparados de manera tradicional o piensos que contienen aislados naturales, sus productos metabólicos como las bacteriocinas y/o péptidos bioactivos, se

liberan en el tracto gastrointestinal del consumidor. El consumo de este tipo de alimentos, no muestran ninguna influencia negativa sobre la salud pese a consumirse durante un tiempo prolongado (Lozo et al., 2021). Hay estudios que sugieren beneficios probióticos de aislados de *E.faecium* en alimentos fermentados naturalmente. Consecuencia de ello, se han introducido en el mercado al menos dos cepas del género como probióticos: *E. faecium* SF68® (NCIMB 10415; Cerbios-Pharma SA, Barbengo, CH) y *E. faecalis* Symbioflor 1 (SymbioPharm,Herborn,DE) (De Farias et al., 2021).

2.15.- Referencias bibliográficas

- Abo-Amer, A. E. (2010). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61(3), 445-452. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0157-6>
- Aguilar-Galvez, A., Guillermo, S., Dubois-Dauphin, R., Campos, D., & Thonart, P. (2011). The influence of growth conditions on enterocin-like production by enterococcus faecium CWBI-B1430 and enterococcus mundtii CWBI-B1431 isolates from artisanal Peruvian cheeses. *Annals of Microbiology*, 61(4), 955-964. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0219-4>
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Sotto, A., Lavigne, J., & Molle, V. (2021). Staphylococcus aureus toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 13(10), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Alvarado, C. J., García-Almendárez, B. E., Martin, S. E., & Regalado-González, C. (2005). Anti-Listeria monocytogenes Bacteriocin-Like inhibitory substances from enterococcus faecium UQ31 isolated from artisan Mexican-Style cheese. *Current Microbiology*, 51(2), 110-115. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4549-y>
- Arumugam, T., Dhanam, S., Rameshkumar, N., Krishnan, M., & Kayalvizhi, N. (2018). Inhibition of methicillin resistant Staphylococcus aureus by bacteriocin producing pseudomonas aeruginosa. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 25(1), 339-348. <https://doi.org/10.1007/s10989-018-9676-y>
- BACTIBASE. (s. f.). *Thank you for your interest in our BACTIBASE*. Recuperado 6 de septiembre de 2023, de <http://bactibase.hammamilab.org/main.php>
- Bağcı, U., Toğay, S. Ö., Temiz, A., & Ay, M. (2019). Probiotic characteristics of bacteriocin-producing enterococcus faecium strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica*, 64(6), 735-750. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00687-2>
- Belgacem, Z. B., Rehaïem, A., Bernárdez, P. F., Manai, M., & Pastrana, L. (2012). Interactive effects of pH and temperature on the bacteriocin stability by response surface analysis. *Microbiology*, 81(2), 195-200. <https://doi.org/10.1134/s002626171201002x>
- Benítez-Chao, D. F. (2021). *Control poblacional y oscilatorio utilizando el quorum sensing de Staphylococcus aureus mediante un circuito genético de Escherichia coli* [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma de Nuevo León.
- Benmouna, F. D. Z., & Karam, H. Z. N. (2018). Optimization and some characteristics of bacteriocin produced by enterococcus Sp. CM9 collected from Mauritanian camel milk. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(4), 275. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i4.1662>

-
- Bizani, D., & Brandelli, A. (2004). Influence of media and temperature on bacteriocin production by *Bacillus cereus* 8A during batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(2). <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1570-1>
- Campanero-Pintado, C. (2018). *Caracterización bioquímica y genética de la infantarina A: Una nueva bacteriocina antineumocócica producida por la cepa de origen lácteo «Streptococcus infantarius» subesp. «Infantarius» LP90* [Tesis de doctorado]. Universidad Complutense de Madrid.
- Cheung, G. Y. C., Bae, J. S., & Otto, M. (2021). Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence*, 12(1), 547-569. <https://doi.org/10.1080/21505594.2021.1878688>
- De Farias, F. M., Teixeira, L. M., Vallim, D. C., De Freire Bastos, M. D. C., Miguel, M. A. L., & Bonelli, R. R. (2021). Characterization of enterococcus faecium E86 bacteriocins and their inhibition properties against listeria monocytogenes and vancomycin-resistant enterococcus. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(3), 1513-1522. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00494-3>
- De Freire Bastos, M. D. C., De Farias, F. M., Fagundes, P. C., & Coelho, M. L. V. (2020). Staphylococcins: An update on antimicrobial peptides produced by staphylococci and their diverse potential applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(24), 10339-10368. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10946-9>
- De Souza De Oliveira Azevedo, P., Converti, A., Gierus, M., & De Souza Oliveira, R. P. (2018). Antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substance produced by pediococcus pentosaceus: from shake flasks to bioreactor. *Molecular Biology Reports*, 46(1), 461-469. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4495-y>
- De Souza De Oliveira Azevedo, P., De Azevedo, H. F., Figueroa, E., Converti, A., Domínguez, J. M., & De Souza Oliveira, R. P. (2019). Effects of pH and sugar supplements on bacteriocin-like inhibitory substance production by pediococcus pentosaceus. *Molecular Biology Reports*, 46(5), 4883-4891. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04938-w>
- Dept of Pathology & Microbiology. (2023, enero). *Antimicrobial Peptide Database*. University of Nebraska Medical Center. Recuperado 6 de septiembre de 2023, de <https://aps.unmc.edu/home>
- Duman-Özdamar, Z. E., Ünlü, A., Ünal, H., Woodley, J. M., & Binay, B. (2021). High-yield production of active recombinant *S. simulans* lysostaphin expressed in *E. coli* in a laboratory bioreactor. *Protein Expression and Purification*, 177, 105753. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105753>
- Fugaban, J. I. I., Bucheli, J. E. V., & Holzapfel, W. H. (2021). Characterization of partially purified bacteriocins produced by enterococcus faecium strains isolated from soybean

-
- paste active against listeria spp. and Vancomycin-Resistant enterococci. *Microorganisms*, 9(5), 1085. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051085>
- Garmasheva, I., & Oleschenko, L. (2023). Screening of bacteriocin-producing dairy enterococcus strains using low-cost culture media. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1168835>
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., & Kapila, S. (2013). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(1), 47-58. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9153-z>
- Hajikhani, R., Darilmaz, D. Ö., Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2021). Assessment of some metabolic activities and potential probiotic properties of eight enterococcus bacteria isolated from white cheese microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(8), 1259-1274. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01599-3>
- Idrees, M. M., Sawant, S., Karodia, N., & Rahman, A. (2021). Staphylococcus aureus biofilm: morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(14), 7602. <https://doi.org/10.3390/ijerph18147602>
- Joo, H. (2018). Immobilized lipid affinity capture for antimicrobial peptides screening. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s12257-018-0319-0>
- Juárez-Tomás, M. S., Bru, E., Wiese, B., & Nader-Macias, M. E. F. (2010). Optimization of Low-Cost culture media for the production of biomass and bacteriocin by a urogenital Lactobacillus salivarius strain. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2(1), 2-11. <https://doi.org/10.1007/s12602-010-9037-4>
- Khalili-Samani, M., Noormohammadi, Z., Fazeli, M. R., & Samadi, N. (2021). Bacteriocin activity of various Iranian honey-associated bacteria and development of a simple medium for enhanced bacteriocin activity. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*. <https://doi.org/10.1007/s40201-021-00615-y>
- Kumari, R., Sanjukta, S., Sahoo, D., & Rai, A. K. (2022). Functional peptides in Asian protein rich fermented foods: production and health benefits. *Systems Microbiology and Biomanufacturing*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s43393-021-00040-0>
- Lasik-Kurdyś, M., & Sip, A. (2018). Evaluation of the antimicrobial activity of bacteriocin-like inhibitory substances of enological importance produced by oenococcus OENI isolated from wine. *European Food Research and Technology*, 245(2), 375-382. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3169-2>
- López-Cuellar, M., Rodríguez-Hernández, A. I., & Chavarría-Hernández, N. (2016). LAB bacteriocin applications in the last decade. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(6), 1039-1050. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1232605>
-

-
- Lozo, J., Topisirović, L., & Kojić, M. (2021). Natural bacterial isolates as an inexhaustible source of new bacteriocins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(2), 477-492. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-11063-3>
- Matereke, L. T., & Okoh, A. I. (2020). *Listeria monocytogenes* virulence, antimicrobial resistance and Environmental Persistence: A review. *Pathogens*, 9(7), 528. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070528>
- Modiri, S., Kermanshahi, R. K., Soudi, M. R., Dad, N., Ebadi, M., Zahiri, H. S., & Noghabi, K. A. (2021). Growth optimization of *Lactobacillus acidophilus* for production of antimicrobial peptide acidocin 4356: Scale up from flask to Lab-Scale fermenter. *PubMed*, 19(3), e2686. <https://doi.org/10.30498/ijb.2021.218725.2686>
- Obioha, P. I., Ouoba, I. L., Anyogu, A., Awamaria, B., Atchia, S. M., Ojimelukwe, P. C., Sutherland, J. P., & Ghoddusi, H. B. (2021). Identification and characterisation of the lactic acid bacteria associated with the traditional fermentation of dairy fermented product. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 869-881. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00461-y>
- ONU. (2022, junio 7). Los alimentos contaminados cuestan 420.000 vidas y 95.000 millones de dólares en pérdidas al año. Noticias ONU. <https://news.un.org/es/story/2022/06/1509842>
- Popa, E. E., Ungureanu, E., Geicu-Cristea, M., Miteluț, A. C., Drăghici, M., Popescu, P. A., & Popa, M. E. (2023). Trends in food pathogens risk attenuation. *Microorganisms*, 11(8), 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11082023>
- Qiao, X., Du, R., Wang, Y., & Han, Y. (2019). Isolation, characterisation and fermentation optimisation of Bacteriocin-Producing enterococcus faecium. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3173-3181. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00634-9>
- Rathod, N. B., Nirmal, N. P., Pagarkar, A. U., Özoğul, F., & Rocha, J. M. (2022). Antimicrobial impacts of microbial metabolites on the preservation of fish and fishery products: A review with current knowledge. *Microorganisms*, 10(4), 773. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040773>
- Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., De Melo Franco, B. D. G., De Souza Oliveira, R. P., & Todorov, S. D. (2013). Comparison of bacteriocins production from enterococcus faecium strains in cheese whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, 64(1), 321-331. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0667-0>
- Sibanda, T., & Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The role of stress adaptation. *Microorganisms*, 10(8), 1522. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10081522>
- Sudha, S., & Aranganathan, V. (2021). Experimental elucidation of an antimycobacterial bacteriocin produced by ethnomedicinal plant-derived *Bacillus subtilis* (MK733983).
-

-
- Archives of Microbiology*, 203(5), 1995-2006. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02173-7>
- Todorov, S. D., Popov, I., Weeks, R., & Chikindas, M. L. (2022). Use of bacteriocins and bacteriocinogenic beneficial organisms in food products: Benefits, challenges, concerns. *Foods*, 11(19), 3145. <https://doi.org/10.3390/foods11193145>
- Trejo-González, L., Gutiérrez-Carrillo, A. E., Rodríguez-Hernández, A. I., Del Rocío López-Cuellar, M., & Chavarría-Hernández, N. (2021). Bacteriocins produced by LAB isolated from cheeses within the period 2009–2021: a review. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 14(2), 238-251. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09825-0>
- Townsend, A., Strawn, L. K., Chapman, B., & Dunn, L. (2021). A systematic review of listeria species and listeria monocytogenes prevalence, persistence, and diversity throughout the fresh produce supply chain. *Foods*, 10(6), 1427. <https://doi.org/10.3390/foods10061427>
- Turgis, M., Vu, K. D., Millette, M., Dupont, C., & Lacroix, M. (2015). Influence of environmental factors on bacteriocin production by human isolates of lactococcus lactis MM19 and pediococcus acidilactici MM33. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 8(1), 53-59. <https://doi.org/10.1007/s12602-015-9204-8>
- Vázquez, J. A., Mirón, J., González, M., & Murado, M. (2005). Effects of aeration on growth and on production of bacteriocins and other metabolites in cultures of eight strains of lactic acid bacteria. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 127(2), 111-124. <https://doi.org/10.1385/abab:127:2:111>
- Wang, S., Tian, R., Liu, B., Wang, H., Li, J., Li, C., Li, M., Evivie, S. E., & Li, B. (2021). Effects of carbon concentration, oxygen, and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01257-x>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH, and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Zuin, V. G., & Ramin, L. Z. (2018). Green and Sustainable Separation of natural products from Agro-Industrial waste: Challenges, potentialities, and Perspectives on emerging approaches. *Topics in Current Chemistry*, 376(1). <https://doi.org/10.1007/s41061-017-0182-z>

3.- Justificación

Las bacteriocinas y las BLIS son agentes antimicrobianos con aplicaciones potenciales prometedoras tanto para el procesamiento de alimentos como en el control de enfermedades infecciosas o terapias anticancerígenas, entre otras. Esto debido al amplio espectro de acción de las bacteriocinas sea individualmente o en combinación, proporcionando alternativas efectivas para combatir un número significativo de organismos diana (De Farias et al., 2021; De Freire Bastos et al., 2020; López-Cuellar et al., 2016).

Sin embargo, la producción de bacteriocinas es limitada ya que los medios de cultivo comúnmente utilizados para producirlas son muy complejos y de alto costo. El uso de fuentes de carbono baratas, especialmente de aquellas que resultan de procesos industriales o bproductos agrícolas, pueden ser una opción para reducir el costo de su producción (Schirru et al., 2013).

Por lo anterior, en esta investigación se explora la producción de biomasa y péptidos con posible actividad antimicrobiana por 1) *Enterococcus faecium* y 2) *Streptococcus infantarius*, utilizando medios de cultivo que incorporen residuos agroalimentarios como suero de leche, melaza y aguamiel, con el objetivo de maximizar producciones y especialmente proponer biotecnologías que contribuyan al desarrollo social sostenible.

4.- Hipótesis

La formulación de medios de cultivo alternativos que incorporen residuos agroindustriales como suero de leche, melazas y jarabe de maguey podrían ser una alternativa viable para la sustitución de medios de cultivo comerciales, ya que no difieren significativamente en la producción de péptidos antimicrobianos a partir de bacterias ácido-lácticas aisladas de alimentos artesanales mexicanos.

5.- Objetivos

5.1.- Objetivo general

Determinar un proceso de fermentación que aporte altas productividades de biomasa y/o péptidos con actividad antimicrobiana por bacterias ácido-lácticas, con potencial aplicación como bioconservantes en la industria alimentaria.

5.2.- Objetivos específicos

- 1.- Proponer dos medios de cultivo alternativos que contengan suero, melaza y aguamiel, con diferente relación carbono/nitrógeno, para la producción de biomasa y/o péptidos con actividad antimicrobiana por 1) *Enterococcus faecium*, y 2) *Streptococcus infantarius*.
- 2.- Evaluar la productividad de biomasa y péptidos antimicrobianos por 1) *Enterococcus faecium*, y 2) *Streptococcus infantarius*, en procesos de fermentación con los dos medios de cultivo alternativos.

6.- Capítulo II

Enterococcus faecium

6.1.- Introducción

Enterococcus es el tercer género de bacterias ácido lácticas (BAL) más grande, que ha tenido un crecimiento en los últimos años, de 26 especies determinadas en 2003 a 62 especies descritas con publicaciones validadas (de acuerdo con la información recopilada de la lista de nombres procariontes con posición a la nomenclatura [<http://www.bacterio.net/enterococcus.html#r>]) consultada en noviembre del 2023 (Meier-Kolthoff et al., 2021) donde están incluidas las especies *Enterococcus faecium* y *Enterococcus faecalis* que se consideran los miembros más importantes de este género. Donde se reconoce en este género la agrupación como cocos individuales, en pares o cadenas cortas y Gram positivos (Dinçer & Kivanç, 2021; Hajikhani et al., 2021).

Enterococcus son BAL de importancia en microbiología médica, microbiología industrial y de salud pública. Además, se encuentran en muchos productos alimenticios, incluidos productos lácteos, productos cárnicos (crudos o procesados), verduras, aceitunas y mariscos, adicional de que son habitantes naturales del tracto gastrointestinal de humanos y animales. También se localizan en el suelo, el agua, las plantas y como probióticos. Desempeñan una función útil, dado que son uno de los grupos de microorganismos importantes en la industria alimentaria porque contribuyen al desarrollo de sabor y aroma, mejorando la calidad del alimento a través de la proteólisis, lipólisis y glucólisis. *Enterococcus* tienen implicaciones importantes en la industria láctea, dado que se encuentran como BAL no iniciadoras en una variedad de quesos, especialmente quesos tradicionales, y en cultivos iniciadores de leche natural o suero (Dinçer & Kivanç, 2021; Hajikhani et al., 2021; Jahansepa et al., 2019; Strateva et al., 2015).

Pese a la actual controversia que se ha generado alrededor del género *Enterococcus*, se ha confirmado que muchas cepas que pertenecen a este género no son patógenas, especialmente aquellas especies pertenecientes a *E. faecium*, que han sido utilizadas en el sector alimentario como cultivos iniciadores, adjuntos o protectores. Siendo que hay cepas para *Enterococcus* que son recomendadas por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) como aditivos y complementos alimentarios. Además también han sido utilizadas como probióticos (Dinçer & Kivanç, 2021). La relevancia que toman este grupo de microorganismos está ligada a que son capaces de producir bacteriocinas conocidas específicamente como enterocinas que actúan como bioconservadores dado que inhiben el crecimiento de una variedad microorganismos responsables y causantes del deterioro de los alimentos y enfermedades transmitidas por estos. La importancia de las enterocinas se debe a su diversidad y su distribución, siendo que pueden ser aisladas de diferentes fuentes, y son particularmente activas contra bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Clostridium* spp. Este tipo de bacteriocinas enterocócicas

pertenecen principalmente a las bacteriocinas de clase II, que inducen la permeabilización de la membrana citoplasmática que permite la fuga de componentes intracelulares en las bacterias diana. Ante esto, es sabido que Enterococos son productores de bacteriocinas que ofrecen diversos beneficios para la salud, entre las cuales se incluyen el tratamiento de la diarrea, la inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y la estimulación de respuesta inmunitaria. Las bacteriocinas enterocócicas son potencialmente útiles para prevenir enfermedades bacterianas transmitidas por los alimentos (Aguilar-Galvez et al., 2011; Dinçer & Kivanç, 2021; Lee, Park, Lee et al., 2021).

6.2.- Materiales y métodos

6.2.1.- Microorganismos

- *Enterococcus faecium* (*E. faecium*), aislado del queso Cotija y conservado por el Cuerpo Académico de Biotecnología Agroalimentaria (CABA) (Trejo-González, 2021). *E. faecium* fue conservado en viales de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo MRS) a -72 °C (Ultracongelador REVCO). Para su activación, se descongeló un vial y en 5 mL de caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) estéril se inocularon (1% v/v) con la cepa, dándole un periodo de incubación de 24 h a 37°C.
- *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), proporcionada por el Laboratorio estatal de salud pública del estado de Hidalgo y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC-25923, ambas conservadas a -72 °C (Ultracongelador REVCO) cada una en viales de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo BHI). Para su activación, se descongeló un vial y 5 mL de caldo BHI estéril se inocularon (1% v/v), dando un periodo de incubación de 24 h a 35°C.

6.2.2.- Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación y activación de microorganismos se usó caldo de Man-Rogosa-Sharpe para la BAL y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* ATCC-25923.

Para las fermentaciones se usaron los siguientes medios de cultivo:

- 1) Caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD™ DIFCO, Francia).
- 2) Medio 1 (M1): Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon® México) 5 g/L, extracto de carne (BD Bioxon® México) 10 g/L, extracto de levadura (BD Bioxon® México) 5 g/L, melaza (Ingenio azucarero: San José de Abajo, Veracruz, México. Zafra 2021-2022) 5 g/L, Pharmamedia (Traders Protein, USA.) 1g/L, Proflo (Traders Protein, USA.) 1g/L, suero de leche en polvo (Food Technologies Trading S.A. de C.V, México) 15 g/L y Tween 80 (Hycel, México) 1g/L.

-
- 3) Medio 2 (M2): Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon® México) 5 g/L, extracto de carne (BD Bioxon® México) 10 g/L, extracto de levadura (BD Bioxon® México) 5 g/L, jarabe de maguey (Botánica tradicional, México) 5 g/L, Pharmamedia (Traders Protein, USA.) 1g/L, Proflo (Traders Protein, USA.) 1g/L, suero de leche en polvo (Food Technologies Trading S.A. de C.V, México) 15 g/L y Tween 80 (Hycel, México) 1g/L.

6.2.3.- Reactivos químicos

Hidróxido de sodio (NaOH) (Química Meyer, México), fenol, ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) (J.T. Baker®, México), Cloruro de sodio (NaCl) (J.T.Baker®, México), Nisaplin® (Nis) (DANISCO, Reino Unido).

6.2.4.- Metodología para la producción de *Enterococcus faecium*

Se prepararon 500 mL de caldo MRS según indicaciones del fabricante, M1 y M2 se prepararon 500 mL de cada uno y se ajustó el pH (Microprocesador Hanna pH 211) a uno cercano a 7 con NaOH 5 M.

Posteriormente se inocularon el caldo MRS, M1 y M2 con la cepa de *E. faecium* (1% v/v) con 24 h de activación (Figura 1). Una vez inoculado el medio de cultivo a utilizar, se homogenizó y distribuyó en tubos de centrifuga de 50 mL (Corning®) estériles hasta los 40 mL de capacidad, mismo que fue incubado (Sheldon, GI6) a 37°C, sin agitación durante 24 h. Los experimentos fueron hechos por duplicado.

Durante la cinética de fermentación, se tomaron 2 tubos de centrifuga, considerando los tiempos para muestrear y procesar cada par de tubos desde el tiempo de 0 h, continuando con los tiempos 3, 6, 9, 12 h y concluyendo con el tiempo 24 h. A dicho par de tubos se le realizó durante el procesamiento de muestras en la cinética la medición de pH, densidad óptica, concentración de biomasa y a los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos la actividad antimicrobiana y la determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956).



Figura 1 Matraz inoculado con *Enterococcus faecium*.

6.2.5- Concentración de biomasa

Las muestras de 40 mL de cada tiempo evaluado fueron inicialmente sometidas a un tratamiento térmico (1024 Shaking Water Bath Foss Tecator) a 80°C por 10 min y posteriormente centrifugadas a 6000 rpm, 4°C durante 20 min (Centrifuga refrigerada Hermle Z323K), al pellet de biomasa obtenido se le realizaron dos lavados con una solución de NaCl (0.9% p/v) y se centrifugaron a 6000 rpm, 4°C durante 15 min. Posteriormente el pellet obtenido se llevó a peso seco (100°C, 24 h) en un horno de convención (Drying Oven DHG-9075A).

La concentración de biomasa se calculó usando la siguiente ecuación:

$$x = ((Pt + x) - Pt)/Vm \quad (1)$$

Donde x es la concentración de biomasa (g/L). Pt es el peso del tubo (g), $Pt+x$ es el peso del tubo más biomasa (g) y Vm el volumen de la muestra (L). Esos datos se graficaron en función del tiempo. El sobrenadante libre de células (SLC) se conservó para ensayos de actividad antimicrobiana (AaM) y el contenido de azúcares totales (Sánchez-Reyes, 2014).

Es importante mencionar que a uno de los SLC de cada tiempo evaluado le fue ajustado el pH entre 6.5 a 7 con NaOH 5 M y el otro se dejó con el pH indicado en la medición según el tiempo de muestreo que corresponde (Figura 2).



Figura 2 Separación de biomasa y neutralización de sobrenadante libre de células

6.2.6.- Determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956).

Para la cuantificación del consumo de azúcares totales durante la fermentación por *Enterococcus faecium* en los medios de cultivo MRS, M1 y M2 se utilizó el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956; Escalante, 2023), para ello se utilizó un espectrofotómetro Génesis 10 UV-VIS®, para las lecturas de absorbancia correspondientes. La concentración de azúcares totales fue determinada utilizando curvas de calibración de glucosa con ecuación $y = 8.98x - 0.0005$ ($R^2=0.9997$), y $y = 7.2371x - 0.0155$ ($R^2=0.9974$) (Ver “Anexo III”). Todos los ensayos y medidas se realizaron por cuatriplicado (Figura 3).

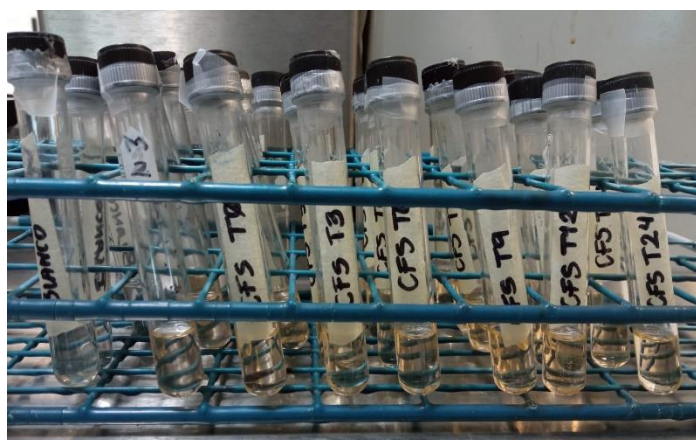


Figura 3 Determinación del consumo de azúcares por método fenol-sulfúrico a sobrenadantes libres de células de cada tiempo muestreado en la cinética.

6.2.7.- Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento

Las fases de crecimiento microbiológico con mayor interés corresponden a las tres primeras que son: adaptación, exponencial y estacionaria, dado que en ellas ocurren los principales procesos metabólicos de interés microbiano como la producción de ciertos metabolitos, cambios en las características de los alimentos, producción de toxinas, etc. Considerando estas fases de la curva, el crecimiento mostrado presenta una forma sigmoideal, de allí que los modelos desarrollados y aplicados sean para ajustarse a dicha forma (Castro et al., 2008).

6.2.7.1- Determinación de velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\max} h^{-1}$)

El modelo de Gompertz fue el primer modelo en ciencia actuarial utilizado para ajustar a un modelo a los datos de mortalidad humana y esta ecuación básica se considera la ecuación más utilizada para describir el crecimiento microbiano en los alimentos en condiciones ambientales controladas y definidas. Esta función se basa en la relación exponencial entre una tasa de crecimiento determinada y la densidad de población. Se pueden crear modelos secundarios a partir de éste (Arzola-Sotelo, 2013; Castro et al., 2008).

$$y(t) = A + C \exp \left[-\exp \left(\frac{-(t-M)}{B} \right) \right] \quad (2)$$

Donde: y cuenta microbiana al tiempo t . A , C , M , B son los parámetros de ajuste del modelo. A inóculo inicial, C diferencia entre la población inicial y final, B velocidad de crecimiento relativa, M tiempo al cual se da B en horas (Ramírez-Barrera, 2011).

En este trabajo para determinar la tasa de crecimiento máxima se estimó mediante regresión no lineal de los datos de biomasa (x) ajustados al modelo de Gompertz de 4 parámetros, utilizando el software SigmaPlot 14:

$$y(t) = y0 + a * \exp \left[-\exp \left(\frac{-(t-x0)}{b} \right) \right] \quad (3)$$

Donde: $y(t)$ cuenta microbiana al tiempo t (h); $x0$, $y0$, a , b son los parámetros de ajuste del modelo generados en el software mediante regresión no lineal.

El valor de $\mu_{\max} (h^{-1})$ se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \quad (4)$$

6.2.7.2.- Determinación de la velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales)

La ecuación que describe el consumo de sustrato (azúcares totales) durante la cinética es sigmoideal de 4 parámetros, utilizando el software SigmaPlot 14 y es la siguiente:

$$y(t) = y0 + \frac{a}{1+\exp\left(\frac{t-c0}{b}\right)} \quad (5)$$

Donde **a**, **b**, **c0** son los parámetros de ajuste del modelo mediante regresión no lineal de los datos de azúcares totales (c); **y0** contenido inicial de azúcares totales; **t** es el tiempo (Orozco-Álvarez et al., 2019).

El valor de qs (h⁻¹g⁻¹x) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{d}{dt} c(t)\right) \cdot \frac{1}{x(t)} \quad (6)$$

6.2.7.3.- Rendimiento

El rendimiento biológico (g_{biomasa}/g_{azúcares totales}), se determinó utilizando la siguiente ecuación.

$$Y_{xs} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_o}{(S_o - S_f)} \quad (7)$$

Donde **X_{máx}** es la máxima biomasa obtenida experimentalmente; **X_o** es la concentración inicial de biomasa; **S_o** la concentración inicial de azúcares totales, y **S_f** la concentración final de azúcares totales (Orozco-Álvarez et al., 2019).

6.2.8.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop-ND1000

Los SLC obtenidos en las cinéticas de fermentación de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h, así como los medios de cultivo MRS, M1 y M2 sin inocular y estériles, les fue realizada la determinación de proteína soluble en NanoDrop-ND1000, para lo cual primeramente fueron concentrados en SpeedVac (Savant SPD2010) en una relación de 5 mL de muestra de SLC reducidos a 1 mL. Posteriormente, dichos concentrados fueron diluidos en una relación de 1:4 con agua destilada estéril, para proceder a tomar lecturas según indicaciones de operación del equipo NanoDrop-ND1000 (Figura 4). Obtenidas las lecturas (a 280 nm), se hizo la corrección con el factor de dilución.



Figura 4 Determinación de proteínas solubles en SLC concentrados en NanoDrop

6.2.9.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*

La determinación CMI se hizo en microplacas (Corning® Costar®), acorde a la metodología de Wiegand et al. (2008) (Figura 5).

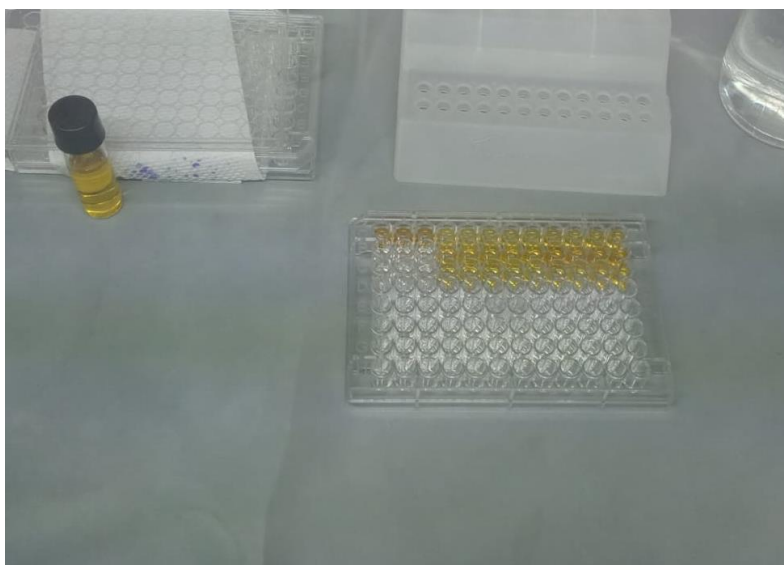


Figura 5 Determinación de CMI en microplaca.

En lo que corresponde al microorganismo indicador, fue tratado de la siguiente manera:

L. monocytogenes y *S. aureus* fue inoculado (1% v/v) en 5 mL de medio BHI estéril y colocado a incubar (Sheldon GI6) a 35 °C durante 24 h, pasado este tiempo, se realizó una resiembra nuevamente con 50 µL de suspensión bacteriana ya activa en 5 mL de caldo BHI estéril, de nuevo, se incubó a 35 °C durante 6 h, dependiendo el microorganismo indicador patógeno, se obtienen diferentes concentraciones al finalizar las 6 h, mostradas en la Tabla 1.

Transcurridas las 6 h, todos los microorganismos se diluyeron hasta concentraciones del orden 10^5 UFC/mL, mediante diluciones base 10, utilizando solución salina (0.9% p/v NaCl) como diluyente (Pérez-Arauz et al., 2020).

La concentración de biomasa microbiana inicial (X_0) fue de 5 log CFU/mL, los medios de cultivo fueron BHI para *L. monocytogenes* y *S. aureus*. El volumen de líquido por pocillo en placa fue de 220 µL. Las placas fueron incubadas a 35°C, 120 rpm durante 24 h en una incubadora con agitación orbital (Barnstead Lab-Line MAX Q 5000, Thermo Scientific) con lecturas de absorbancia (545 a 630 nm) a las 0, 18 y 24 h con un Stat Fax 2100 (Awareness Technology Inc., FL, EE. UU.). Se incluyeron dos tipos de controles: control biótico (medios de cultivo inoculados con el microorganismo, pero sin los SLC de las fermentaciones o Nis); control abiótico (medio de cultivo estéril, pero sin microorganismo) (Tabla 2) (“Ver anexo VII”) (Trejo-González, 2021).

Los experimentos fueron realizados por triplicado.

Tabla 1 Concentraciones alcanzadas a las 6 h de incubación para los 2 microorganismos indicadores usados (Trejo-González, 2021).

Microorganismo Indicador	UFC/mL
<i>L. monocytogenes</i>	8.3×10^8
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	5.6×10^8

Tabla 2 Concentración de proteína de sobrenadantes libres de células (SLC) y controles, empleados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Enterococcus faecium*.

Microorganismo Indicador	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Controles / SLC	Concentraciones empleadas (mg/mL)	
Nisina	5, 10, 15, 20, 40, 160	20, 40, 80, 100, 120, 160
MRS	20, 35	35
M1	40	15, 20, 35, 40
M2		
SLC T0	5, 10, 15, 20, 35, 40	20, 24, 33, 40
SLC T3		
SLC T6		
SLC T9		
SLC T12		
SLC T24		

MRS De Man Rogosa-Sharpe, ^{M1} Medio de cultivo alternativo No.1, ^{M2} Medio de cultivo alternativo No.2

6.2.10.- Análisis estadístico de las CMI

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza en SPSS v.25.00 (Chicago, Illinois, EE. UU.). Las medias con una diferencia significativa se compararon mediante pruebas de comparación de medios mediante HSD Tukey. Los valores $p > 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.3.- Resultados y discusiones

Durante la cinética de crecimiento, un parámetro monitoreado fue el pH, que tiene un efecto directo sobre la actividad enzimática de los microorganismos y, por ende, sobre el crecimiento celular y la producción de varios metabolitos, como las bacteriocinas, ya que los mecanismos que regulan su producción y actividad es dependiente del pH (Sidooski et al, 2018). La figura 6, muestra el comportamiento de acidificación del medio de cultivo que se produce en los 3 medios de cultivo utilizados: MRS, M1 y M2. Inicialmente, los medios de cultivo tuvieron un pH inicial neutro lo más cercano al intermedio de 6.5 a 7.

En la figura 6 se observa una clara acidificación durante el crecimiento de la BAL en cada uno de los medios de cultivo. Los medios M1 y M2 alcanzaron un pH promedio de 5.07 ± 0.098 y 4.795 ± 0.261 , respectivamente. Sin embargo, las formulaciones M1 y M2 no acidifican al medio respecto a lo obtenido en el medio control MRS (4.575 ± 0.049 pH). Lo anterior, puede deberse a que los medios alternativos M1 y M2 contienen en sus formulaciones suero de leche, donde la proteína del mismo se considera que posee una alta capacidad amortiguadora (Moreira et al., 2015). Los pH alcanzados en los medios de cultivo utilizados coinciden con valores reportados en la literatura para la misma especie, para una cepa aislada de un queso panela y cultivada a condiciones de agitación (no indicadas) a 30°C y en medio MRS, reporta un pH inicial de 6.4 donde al termino 19 h alcanzó un valor de pH de 4.6 (Alvarado et al., 2005). Por otro lado, cepas aisladas de pasta de soja fermentada, cultivadas a 37°C, sin agitación y en medio MRS reportan valores al final de la cinética de 24 h de 4.3, 4.5 y 4.7 (Fugaban et al., 2021).

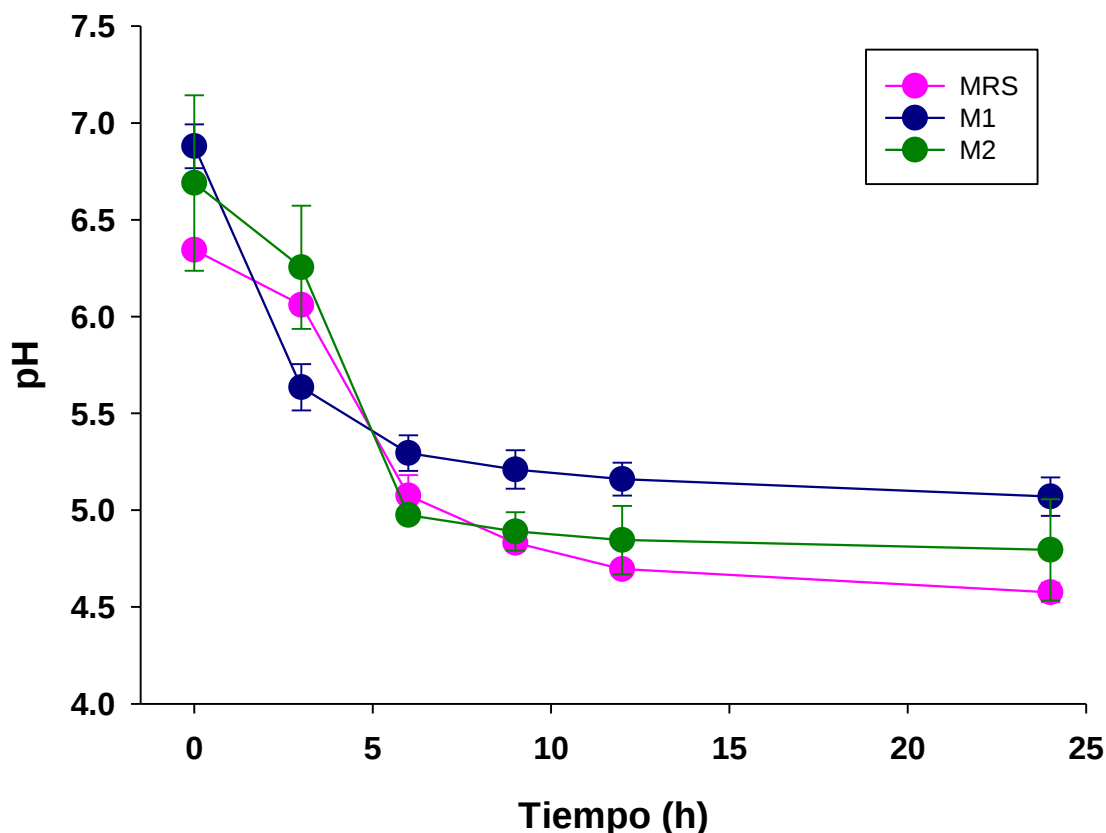


Figura 6 Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* en MRS (medio estándar comercial), y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey) en condiciones de reposo a 37°C.

La Figura 7 indica el comportamiento de crecimiento de *Enterococcus faecium* en los 3 medios de cultivo empleados con diferentes fuentes de carbono, considerando la concentración de biomasa. En la figura se puede notar como las formulaciones de medios de cultivo sugeridas en este proyecto tienen mejores rendimientos de biomasa comparadas con un medio de cultivo estándar comercial (MRS). Ahora bien, las concentraciones máximas de biomasa obtenidas en el medio MRS fueron $0.835 \text{ g/L} \pm 0.161$, en el medio M1 $1.389 \text{ g/L} \pm 0.244$ y en M2 $1.501 \text{ g/L} \pm 0.411$, posicionando con mejores rendimientos de biomasa generadas a estos dos últimos. A este análisis, las muestras obtenidas fueron “corregidas” con un tubo procesado como lo indica la metodología, con medio de cultivo alternativo sin inocular, precisamente para descartar partículas que pudieron quedar suspendidas en la solución, debido al origen de los ingredientes alternativos que conforman a los mismos. El resultado que arroja la determinación de la concentración de biomasa, primeramente, es el comportamiento de crecimiento de la BAL, sin embargo, también permite visualizar la

capacidad que tuvo la bacteria para desarrollarse en el medio propuesto, lo cual se puede apreciar por las curvas obtenidas con las distintas fases de crecimiento de una BAL como *E. faecium*. Por ello, aunque el medio MRS es un medio estándar de uso en laboratorios para su crecimiento, los medios sugeridos en este proyecto tuvieron resultados bastante interesantes, por el hecho de contener en su formulación productos y subproductos de la agroindustria en México como la melaza de caña de azúcar, el suero de leche y el jarabe de maguey. El hecho, de que la cepa de *Enterococcus faecium* haya tenido un buen desarrollo en estos medios alternativos puede atribuirse principalmente a que dado el origen de la cepa utilizada es de una fuente láctea como lo es el queso Cotija, albergue genes específicos que se relacionen con la ruta del metabolismo de la lactosa, facilitando el transporte intracelular y la utilización de la lactosa extracelular (Sosa et al., 2021).

En un trabajo previo utilizando *Enterococcus faecium* pero a condiciones distintas (30°C, estático y 5% de inóculo v/v) y solo en el medio MRS utilizando el método de superficie respuesta (RSM), se obtuvieron resultados de 0.16 ± 0.01 g/L en peso seco y 2.25 ± 0.11 g/L para el medio MRS optimizado (Qiao et al., 2019). Aún con las diferencias en cuanto a medios optimizados o alternativos, podemos sugerir que *Enterococcus faecium* es una cepa que mejora su capacidad de producción de biomasa si se le mejoran condiciones del medio de cultivo donde se desarrolle.

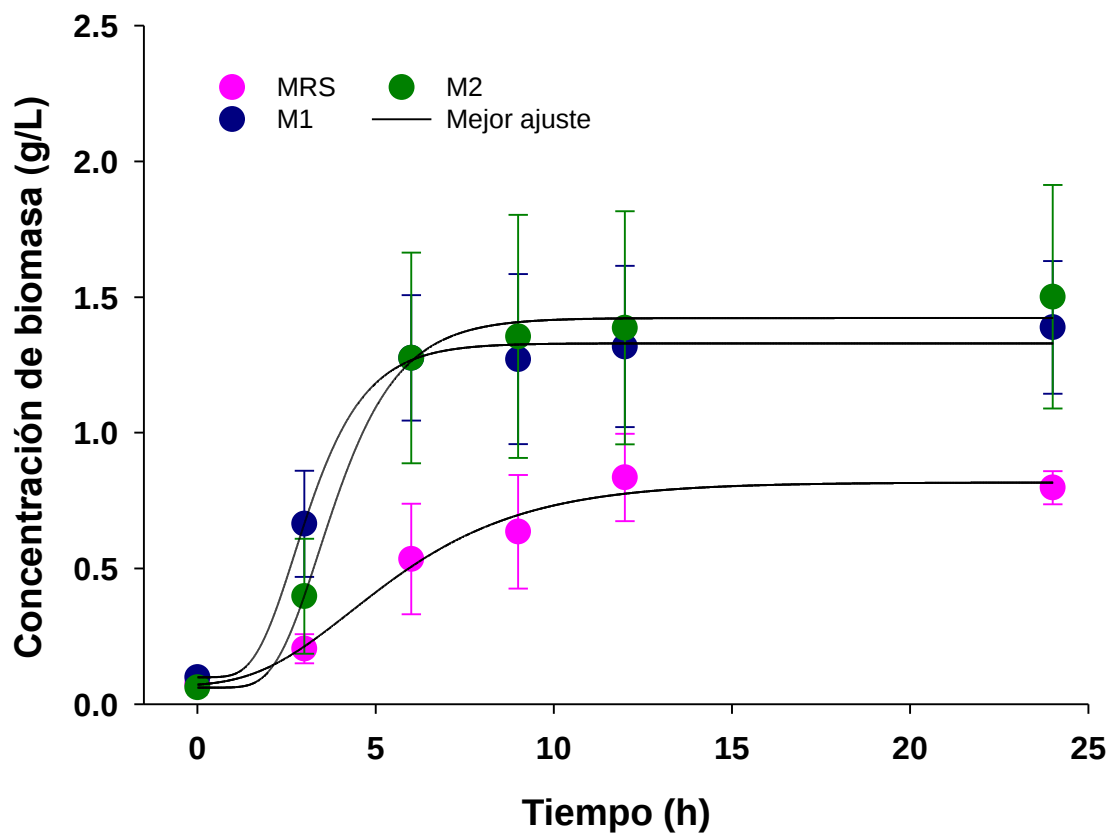


Figura 7 Perfil de fermentación de crecimiento de *Enterococcus faecium* (g/L) durante 24 h en condiciones de reposo a 37°C en medio MRS (medio estándar comercial), y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).

La naturaleza de los ingredientes en los medios formulados es distinta (Figura 8), por ello se determinó el comportamiento que tuvo la BAL para el consumo de azúcares totales disponibles.

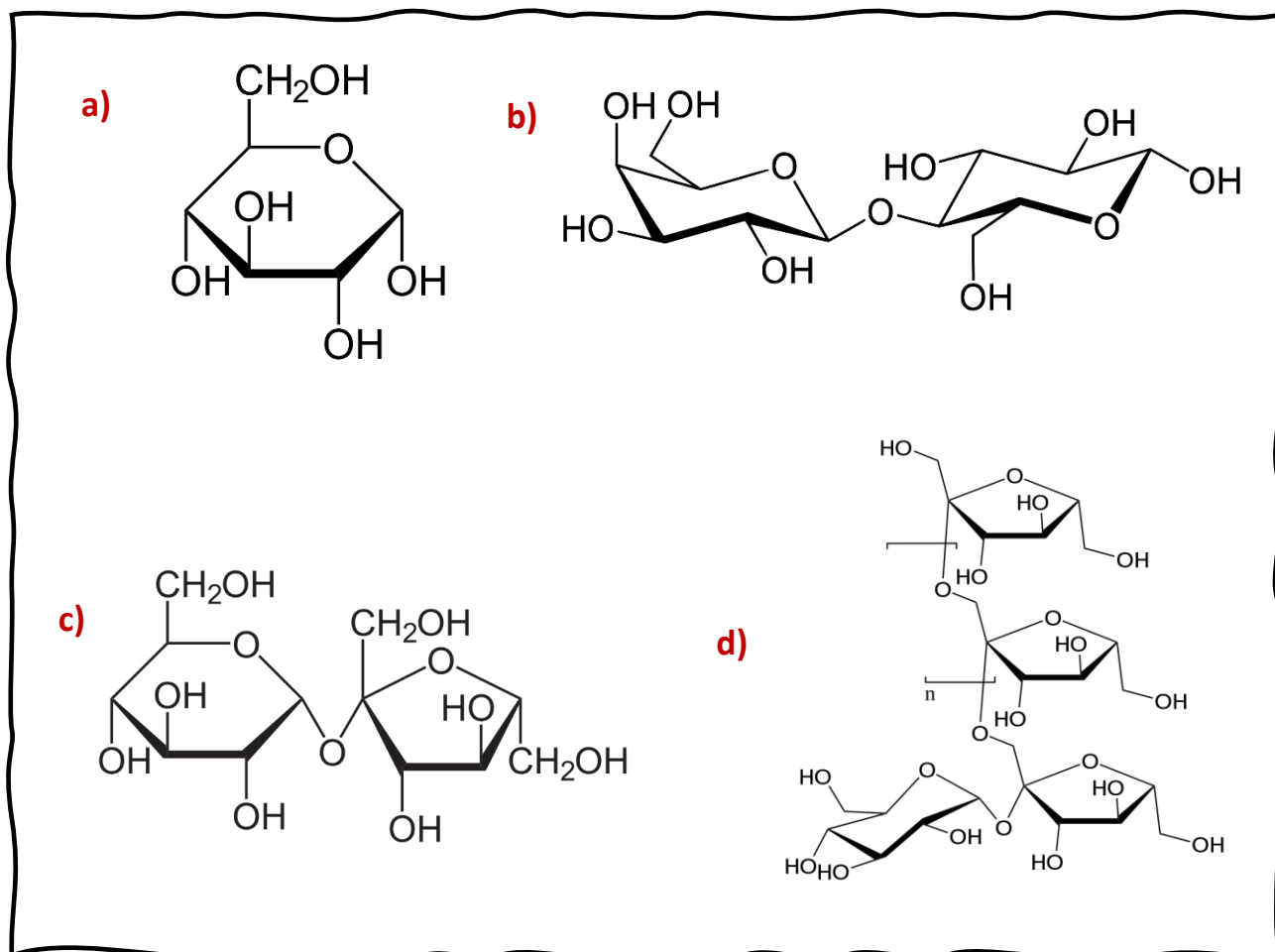


Figura 8 Principales fuentes de carbono en los medios de crecimiento utilizados para *Enterococcus faecium*: a) glucosa (NEUROtiker, s/f-a), b) lactosa (Yikrazuul, s/f) , c) sacarosa (NEUROtiker, s/f-b) e d) inulina (Timin, s/f).

En la Figura 9 se presentan las cinéticas de consumo de la fuente de C, determinadas mediante la prueba de azúcares totales, con ello, se denota que, en los 3 medios de cultivo empleados, no hubo un consumo total de azúcares menos del 50%. *Enterococcus faecium* tuvo un consumo de azúcares totales iniciales de $22.813 \text{ g/L} \pm 2.77$ a $11.952 \text{ g/L} \pm 3.92$ finales, que es un aproximado del 47.6% consumido en el medio de cultivo MRS, para el M1 los azúcares totales iniciales fueron de $17.496 \text{ g/L} \pm 1.78$ hasta $9.337 \text{ g/L} \pm 2.26$ al final de la cinética, dando un consumo aproximado del 46.6%. Por último, en lo que refiere al M2, los azúcares

iniciales del medio fueron $18.874 \text{ g/L} \pm 1.76$ finalizando en $12.012 \text{ g/L} \pm 3.04$ dando un consumo aproximado del 36.3%. De acuerdo con reportes para la BAL *Lactobacillus acidophilus* AA11 por (Abo-Amer, 2010) en prueba de diez fuentes de carbono: sacarosa, glucosa y lactosa fueron fuentes de carbono ideales para el crecimiento bacteriano. En este sentido, el medio MRS tiene en su composición la glucosa como principal fuente de C, el M1 tiene una combinación de lactosa y sacarosa, al tener como fuentes de C el suero de leche y la melaza de caña de azúcar, principalmente (Bali et al., 2014; Parascanu et al., 2021). El M2 tiene en lugar de melaza de caña de azúcar, la combinación de suero de leche con jarabe de maguey, donde las principales fuentes de C serían la lactosa y los fructooligosacáridos (Alcocer et al., 2014; Bali et al., 2014). Considerando que la BAL de este proyecto es de origen lácteo y que no tendría “problema” en metabolizar la lactosa (Sosa et al., 2021), los azúcares como la glucosa, sacarosa y fructooligosacáridos, podrían tener incidencia en el consumo de los azúcares disponibles en el medio de cultivo. La figura 9, muestra claramente como la BAL en el medio MRS tiene un mejor aprovechamiento del consumo de azúcares, atribuido principalmente a la consideración que hay sobre la glucosa como la principal fuente de carbono por todos los microorganismos, dado a su tamaño, rápida absorción, utilización y conversión de energía celular (Choi et al., 2011). Sin embargo, las BAL han demostrado tener capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono basándose en la actividad de enzimas específicas en la degradación de diferentes fuentes de carbono. Implicando principalmente tres clases de enzimas en la formación e escisión de enlaces glucósidos, como las enzimas catabólicas, las sacarosa hidrolasas y fosforilasas y las glicosiltransferasas biosintéticas de glicosil nucleótidos, responsables de la síntesis de carbohidratos (Choi et al., 2011; Jawan et al., 2020). En este sentido, el medio M1 cuenta con sacarosa compuesta por glucosa unida a fructosa mediante un enlace glicosídico y el M2 posee fructooligosacáridos, que al ser jarabe de maguey posiblemente sean en mayor parte inulina, entonces estas moléculas de carbohidratos estarían compuestas por monómeros de fructosa con muy pocos residuos de glucosa que casi siempre están al final de la cadena; también se les conoce como fructanos. Se hace mención de que sean en su mayoría inulina, dado a que en este tipo de fructosas se presenta una unión predominante o exclusiva a través del enlace β -(2-1)-fructosil-fructosa y una glucosa terminal con enlace α -(1-2)-(D-glucopiranosil) recibiendo el nombre genérico de inulina. Donde las unidades pueden variar entre pocas o hasta 70 unidades (Alcocer et al., 2014; Choi et al., 2011). Además, dicha información arrojada en este análisis proporciona herramientas para realizar el cálculo del rendimiento y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales). En un trabajo donde se midió el consumo de la fuente de C pero con los azúcares reductores para la cepa *Leuconostoc mesenteroides* en el medio de cultivo empleado MRS y un medio de cultivo alternativo a base de polvo de harina de pescado, solo se muestrearon los caldos estériles y el sobrenadante libre de células del último tiempo de la cinética, donde en el primero se consumió apenas más de un tercio y en

el segundo más de la mitad de la fuente disponible de carbono (Sosa et al., 2021). Este tipo de análisis proximales que permiten identificar el comportamiento del consumo de la fuente de C (azúcares totales) (Dubois et al., 1956), la cual es de importancia para el crecimiento de cepas productoras de bacteriocinas, ya que es un factor que influye en el precio comercial de las mismas aunado a los métodos de purificación que sean requeridos. Es por ello que las investigaciones sobre el uso de fuentes de carbono baratas, generadas a partir de residuos agroindustriales o agrícolas como la melaza de caña de azúcar (Garmasheva & Oleschenko, 2023) y suero de leche (Schirru et al., 2013), podrían proporcionar una manera de reducir los costes de producción de las bacteriocinas, a la par de una reducción de contaminantes al medio ambiente (Garsa et al., 2014; Schirru et al., 2013).

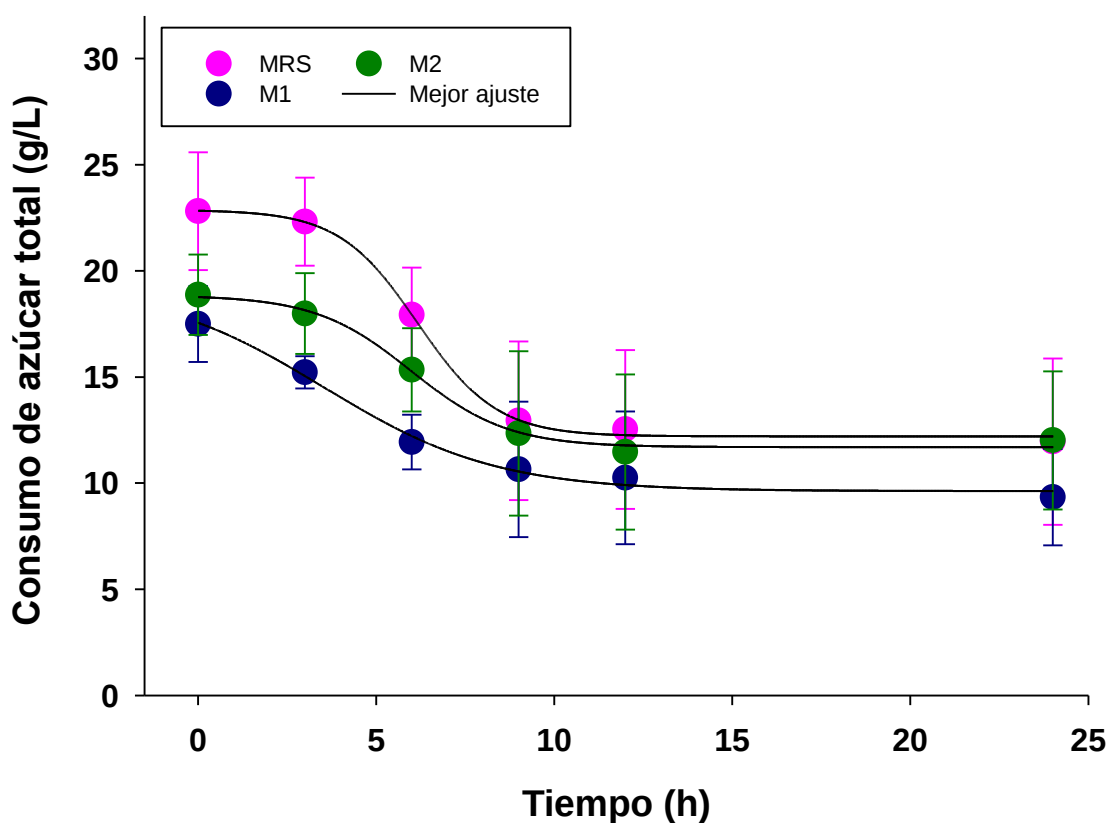


Figura 9 Perfil del consumo de azúcares totales durante la cinética de crecimiento de *Enterococcus faecium* en condiciones de reposo a 37°C en medio de cultivo MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).

6.3.1.- Rendimiento, velocidad de crecimiento máxima y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales)

En la Tabla 3 se hace una síntesis de los resultados con base en los estudios anteriormente desarrollados de manera experimental. Para los datos de concentración de biomasa y del consumo de sustrato (azúcares totales) fueron ajustados al modelo Sigmoidal de Gompertz de 4 parámetros y Sigmoidal de 4 parámetros, respectivamente para cada caso, mediante el programa SigmaPlot v.14, obteniéndose coeficientes de acuerdo al medio de cultivo empleado, para la concentración de biomasa en MRS la $R^2=0.9911$, M1 la $R^2=0.9975$, M2 la $R^2=0.9972$ y para el consumo de azúcares totales en MRS la $R^2=0.9994$, M1 la $R^2=0.9969$, M2 la $R^2=0.9977$ (“Ver anexo V”). Posteriormente, los coeficientes obtenidos fueron asociados con la Ec. (4) y Ec. (6) para concentración de biomasa y consumo de sustrato (azúcares totales), respectivamente, mediante el programa MathCAD Prime 7.0.0.0, para determinar las evoluciones de la velocidad específica de crecimiento ($\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$; h^{-1}) y de velocidad específica de consumo de azúcares totales ($qs = -(\frac{d}{dt} c(t)) \cdot \frac{1}{x(t)}$; $\frac{g \text{ azúcar total}}{g \text{ biomasa}} \cdot h^{-1}$). Para el rendimiento final se empleó la Ec. (7).

Tabla 3 Parámetros obtenidos en cinéticas de fermentación de *Enterococcus faecium* con los distintos medios de cultivo evaluados: MRS como medio control y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).

BAL	Medio de cultivo	Velocidad específica de:		Rendimiento final
		Crecimiento máximo ($\mu_{\text{máx}}$) h^{-1}	Consumo máximo de azúcares totales (qs) $\frac{g \text{ azúcar total}}{g \text{ biomasa}} \cdot h^{-1}$	
<i>Enterococcus faecium</i>	MRS	0.45	4.73	0.07
	M1	1.12	7.08	0.16
	M2	1.25	2.06	0.21

Como ya se presentó anteriormente, las fermentaciones exhibieron cinéticas de crecimiento bacteriano y consumo de azúcares con diferencias interesantes respecto al medio control MRS (Figura 10 y 11). *Enterococcus faecium* presentó en medio de cultivo MRS una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.45 h^{-1} , q_s de $4.73 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento final de $0.07 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$. De primera instancia, podemos apreciar una diferencia notoria del MRS con los medios sugeridos en este proyecto, sin embargo, se encuentran resultados similares entre los mismos. Para el medio de cultivo M1 se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.12 h^{-1} y un rendimiento final de $0.16 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$, mientras que para el M2 los resultados son una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.25 h^{-1} y un rendimiento final de $0.21 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$. La diferencia encontrada mayor fue entre los medios alternativos fue en el q_s donde para M1 fue de $7.08 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y para el M2 fue $2.06 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ (“Ver anexo VII”). Estos resultados nos indican que la BAL tiene una mejor tasa máxima de crecimiento específica en los medios alternativos M1 y M2, al igual que un rendimiento final similar, que nos sugiere una conversión eficiente de la energía en biomasa, pero a pesar de la eficiencia obtenida hay un valor bajo en q_s , pudiéndose explicar en que la BAL presenta mayor dificultad para hidrolizar los azúcares contenidos en el M2, principalmente los atribuidos al jarabe de maguey (fructooligosacáridos del jarabe de maguey), comparados con el M1 a base de suero de leche y melaza de caña de azúcar (lactosa y sacarosa) (Díaz-Ruiz et al., 2003). Otros trabajos han reportado valores para rendimiento en la especie *Enterococcus* más específicamente *E. faecalis* SLT13 a condiciones de 30°C , 100 rpm y biorreactor, con medios de cultivo de M17 que contenía glucosa como principal fuente de C o en suero de queso hidrolizado de papaína (lactosa). En un volumen de trabajo de 2 L con M17 el valor fue de 0.142 h^{-1} , en el medio de suero de queso para un volumen de trabajo de 2 L se obtuvo 0.069 h^{-1} y para 20 L de volumen de trabajo 0.074 h^{-1} , en este trabajo los autores sugieren que la relación de carbono/nitrógeno de este último medio de cultivo favoreció más la producción de ácido láctico (dado que hicieron la determinación y los valores fueron mayores al M17) que para el crecimiento de biomasa (Ziadi et al., 2020).

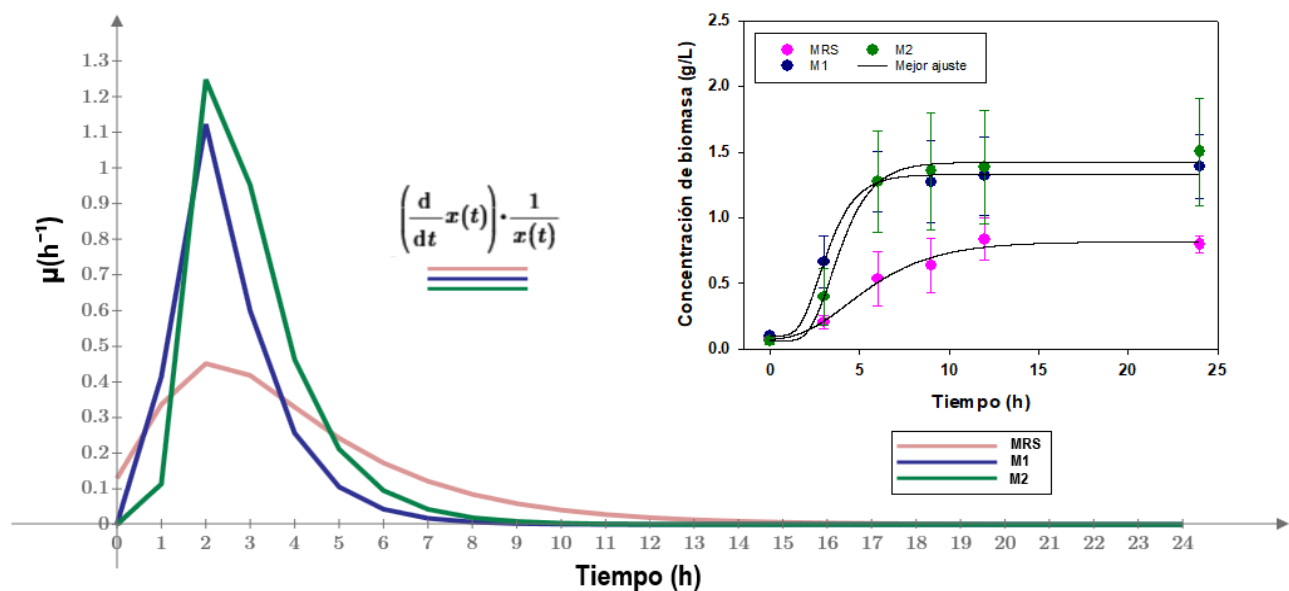


Figura 10 Tasa de crecimiento máxima específica ($\mu_{\text{máx}}$) de *Enterococcus faecium* en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (4)

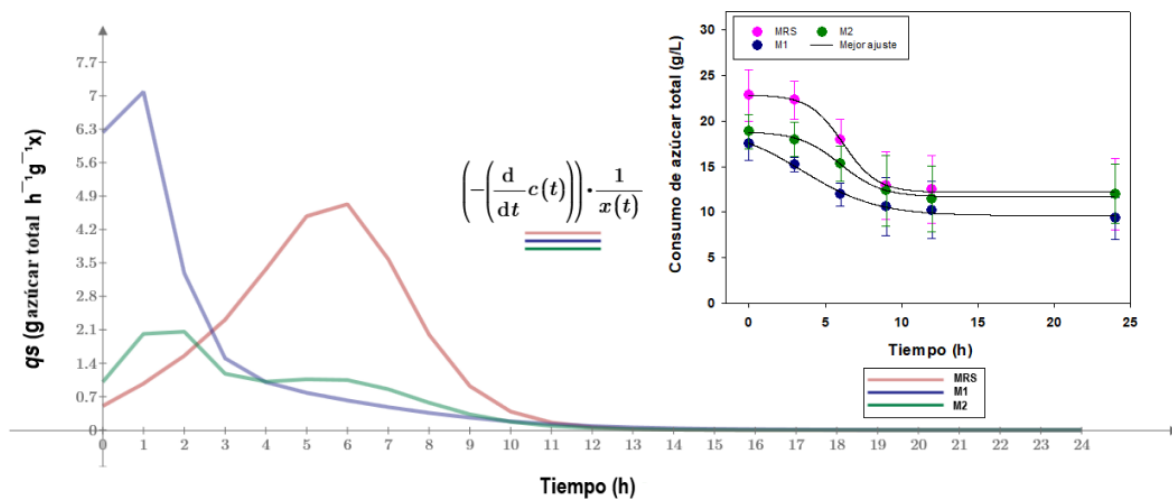
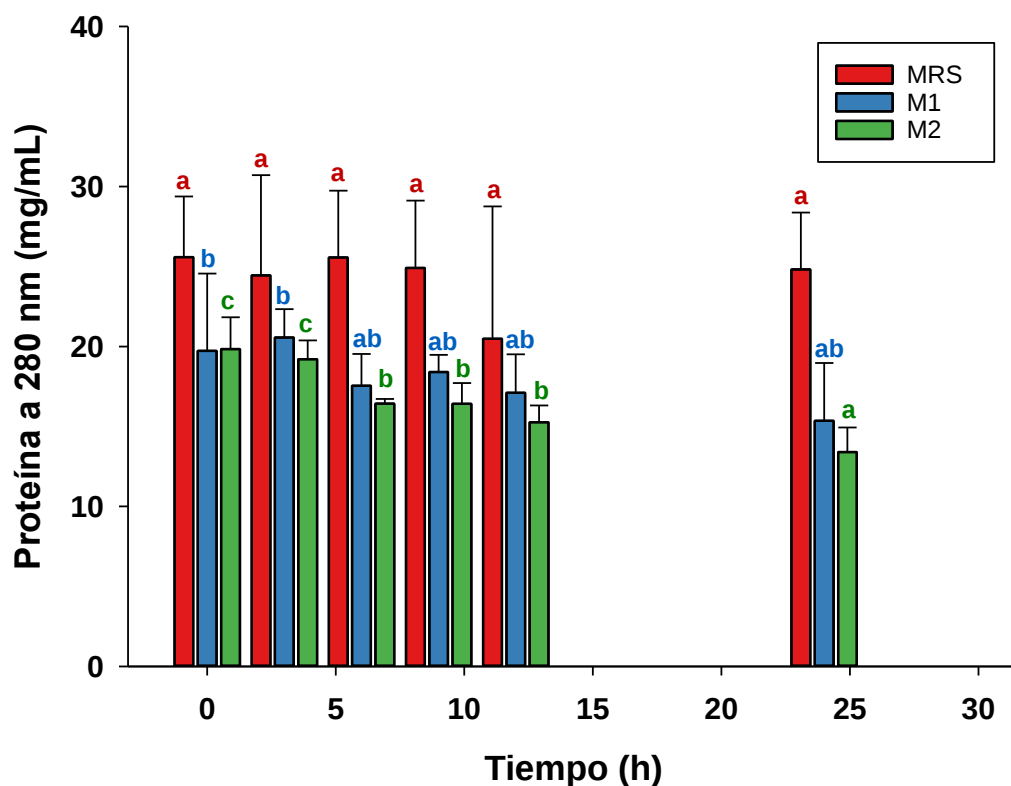


Figura 11 Consumo de azúcares totales (q_s) de *Enterococcus faecium* en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (6)

6.3.4.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop

Las fuentes de nitrógeno son necesarias para todos los procesos de crecimiento biológico, especialmente en la síntesis de proteínas celulares y la producción de ácidos nucleicos, al igual que para el metabolismo bacteriano. En este sentido, tienen un gran impacto sobre la producción de bacteriocinas (Jawan et al., 2020; Sidooski et al., 2018). La determinación de proteínas en los SLC nos permite conocer de alguna manera la cantidad de proteína que podría relacionarse con una producción de bacteriocinas durante la cinética, dada la naturaleza proteica de estas (Sidooski et al., 2018; Sosa et al., 2021). La Figura 12 muestra las concentraciones encontradas en el SLC en cada momento del muestreo durante la cinética de *Enterococcus faecium*, para MRS se encontraron las mayores concentraciones de proteína tanto para el valor mayor como para el valor mínimo en comparación a los demás medios de cultivo empleados, con $25.58 \text{ mg/mL} \pm 3.79$ (T0) y $20.49 \text{ mg/mL} \pm 8.26$ (T12), respectivamente, no encontrándose diferencias significativas entre los tiempos muestreados (letra a). En el M1, el valor mayor obtenido es $20.56 \text{ mg/mL} \pm 1.76$ (T3) y el valor mínimo es de $15.35 \text{ mg/mL} \pm 3.62$ (T24), donde se obtuvieron diferencias significativas, siendo el T24 (letra a) donde se encuentra la menor concentración de proteínas en SLC; los T0 y T3 presentan la mayor concentración de proteína (letra b) entre los tiempos muestreados. Para el M2 el valor máximo de proteína obtenido es $19.84 \text{ mg/mL} \pm 1.97$ (T0) y el valor mínimo es de $13.39 \text{ mg/mL} \pm 1.53$ (T24), donde se obtuvo diferencia significativa al resultar T24 el SLC con menor concentración de proteína (letra a); T0 y T3 con la mayor cantidad de proteína en el SLC (letra c). El que no sea apreciable un descenso drástico en la concentración de proteína pese a las diferencias significativas encontradas entre los tiempos evaluados en los distintos medios de cultivo MRS, M1 y M2, posiblemente se deba a la cantidad de aminoácidos y péptidos encontrados en estos medios de cultivo, necesarios para el crecimiento celular que es relacionado con la producción de bacteriocinas (Sidooski et al., 2018).



^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto del tiempo de fermentación transcurrido en cada muestra sobre la concentración de proteína soluble (mg/mL).

Figura 12 Proteína soluble obtenida en lecturas a 280 nm en NanoDrop en los sobrenadantes libres de células concentrados en SpeedVac de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h de la cinética con *Enterococcus faecium*.

6.3.5.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la Tabla 4 se muestran los resultados para la CMI de la BLIS para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Donde los resultados son expresados de manera cuantitativa, así podremos notar que donde se obtuvo la CMI, tanto en controles utilizados y SLC, además de la diferencia significativa encontrada al someter los resultados obtenidos en la CMI al programa SPSS.v.25.00, donde se realizó la prueba HSD Tukey tanto los controles con SLC, así como las concentraciones utilizadas en las CMI (Ver “Anexo 5”).

Tabla 4 Concentración mínima inhibitoria encontrada en los controles utilizados y en los sobrenadantes libres de células de *Enterococcus faecium* obtenidos durante la fermentación los medios MRS, M1 y M2 para los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Patógeno	Medio de cultivo	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Control	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Sobrenadantes libres de células (SLC)
<i>Listeria monocytogenes</i>	MRS		Nisina ^a	20	T9 ^a , T12 ^a , T24 ^a
	M1	20	Nisina ^a	40	T24 ^{ab}
	M2		Nisina ^a	5	T9 ^a , T12 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRS	80	Nisina ^a	20	T12 ^b
	M1	20	M1 ^a	40	T0 ^b , T9 ^b , T24 ^b
	M2	40	M2 ^{ab}	40	T0 ^c

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

En este sentido, para *L. monocytogenes* en el medio MRS su CMI se encontró para el control en nisina a 20 mg/mL y en los SLC en los T9, T12, T24 también a 20 mg/mL, donde al someter a la prueba HSD Tukey se indica que no hay diferencia significativa al utilizar la nisina o los sobrenadantes de los tiempos antes descritos a razón de 20 mg/mL. Para el M1 su CMI se encontró que la nisina a 20 mg/mL no tiene diferencia significativa respecto al control negativo, sin embargo para los SLC se obtiene que al T24 no se obtiene una diferencia significativa a 40 mg/mL respecto al control negativo o al empleo de la nisina a 20 mg/mL. Lo que respecta al M2, es que la CMI se encuentra en control a 20 mg/mL, pero en SLC en los tiempos T9 y T12 a 5 mg/mL sin tener una diferencia significativa mostrada en letra, respecto al control utilizado que mostró la CMI. Con base en esta información, podemos apreciar como la CMI menor se encuentra con el M2 y en el SLC T9 y T12. Esto, nos indica en primera instancia que existe una producción de una BLIS como las bacteriocinas, concordante con lo reportado en investigaciones que reconocen que la producción de bacteriocinas anti-*Listeria* es una característica común que comparte este grupo de BAL, lo cual puede atribuirse y acentuarse a la estrecha relación filogenética de *Enterococcus*. Los péptidos antimicrobianos que estos producen se conocen como enterocinas (Gupta et al., 2010).

De igual manera, es importante mencionar que se tuvieron resultados como el MRS donde el uso de nisina, con los SLC obtenidos de la fermentación no tuvo diferencias significativas. En el M1, en cambio se tiene que la nisina a 20 mg/mL y el SLC T24 con 40 mg/mL se encuentran catalogados en el mismo subconjunto (ab), no teniendo diferencia significativa

relevante respecto al control negativo (a). Recordemos que la nisina es una bacteriocina obtenida de las BAL (Rathod et al., 2022).

Para el caso de *Staphylococcus aureus*, el panorama es un tanto distinto, en el medio MRS su CMI es de 80 mg/mL con nisina en controles (letra a) y aunque con diferencia significativa (letra b), se encuentra el SLC T12 con la CMI a 20 mg/mL. En el M1 en los controles el M1 a 20 mg/mL tiene la CMI (letra a), con diferencia significativa respecto a los SLC de los T0, T9 y T24 (letra b) a 40 mg/mL. Y para el M2 se obtuvo para los controles la CMI en el M2 a 40 mg/mL (letra ab) sin diferencia significativa respecto al control negativo, pero en el caso de los SLC la CMI se posiciona como “el mejor” el T0 (letra c) a 40 mg/mL. Los casos donde el M1 y M2, tienen la “mejor” CMI puede deberse a que los SLC y controles de los medios de cultivo empleados fueron concentrados a una relación 5:1, con ellos el M1 y M2 tienen una saturación de azúcares, por lo cual no hubo crecimiento del indicador patógeno, derivando en que la concentración excesiva del sustrato natural conduce a altas concentraciones de carbohidratos, lo que aumentará la presión osmótica que cambia o destruye las capacidades de las cepas para transportar y metabolizar cada componente (Wang et al., 2021). Además, lo que respecta a *Staphylococcus aureus*, se podría deducir por lo obtenido que esta cepa, es una cepa resistente al empleo de nisina y SLC probados, dado que no lograron inhibir su crecimiento. Cabe destacar, que el hecho de que en el análisis de la CMI no se hayan encontrado diferencias significativas con respecto a la nisina es valioso, dado que la nisina se utilizó como un control por ser un péptido originado principalmente por la BAL *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* producido en la actualidad a escala industrial, que tiene aplicaciones en el ámbito alimenticio, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los diferentes factores que afectan la producción y purificación de péptidos antimicrobianos son elevados respecto a los costos (Khelissa et al., 2020).

En la mayor parte de los trabajos reportados, se utiliza como prueba antimicrobiana el método de dilución crítica (Alvarado et al., 2005) donde se visualizan zonas de inhibición en una caja Petri, en su mayoría expresadas en UA/mL, que no es más que expresar el recíproco de la dilución más alta que produce una zona de inhibición definida en una placa de agar inoculada con un microorganismo indicador (Cardoso, 2012). En este proyecto se empleó como prueba antimicrobiana la concentración mínima inhibitoria (CMI), donde el principal objetivo es la determinación de la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado (Wiegand et al., 2008). En este sentido, el punto de comparación y referencia sería el tiempo donde se ha reportado actividad antimicrobiana, en las investigaciones donde no se haya aplicado la misma metodología desarrollada en este proyecto. Ahora bien, para cepas de *Enterococcus faecium*, aisladas de algún producto lácteo se han reportado tiempos de producción de bacteriocina de 18 h en medio MRS, a 30°C sin agitación y con actividad vs *L. monocytogenes* (Elotmani et al., 2002). Otro estudio reporta para MRS, a 30 °C y con agitación (300 rpm) la producción de BLIS desde las 4 h permaneciendo hasta las 19 h, donde dichos SLC tienen actividad vs *L. monocytogenes* (Alvarado et al., 2005). Un estudio

con medios alternativos a base de melaza de caña de azúcar como ingrediente en su formulación reporta cepas de *Enterococcus faecium* con actividad contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Garmasheva & Oleschenko, 2023). Otros trabajos, reportan a la lactosa como fuente de carbono más adecuada para la producción de la BLIS, producida su mayor actividad después de las 9 h con una menor capacidad de inhibición después de 14 h y con actividad contra *L. monocytogenes* (Aguilar-Galvez et al., 2011). Cabe mencionar que existen reportes publicados que señalan que no hay actividad antimicrobiana de SLC de *Enterococcus faecium* para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Sosa et al., 2021) en medios como MRS y alternativos con suero de leche y un residuo de la industria cervecera llamado trub caliente, pese a existir un buen desarrollo de crecimiento de la BAL. Lo cual puede justificarse con que la tasa de crecimiento no se correlaciona con la síntesis de bacteriocinas de igual manera en todas las cepas productoras (Garmasheva & Oleschenko, 2023).

Por otra parte, en cuanto a la CMI hay reportes de *E. faecium* para *Listeria monocytogenes* de 10 mg/mL y *Staphylococcus aureus* de 25 mg/mL en medio comercial MRS (Ankaiah et al., 2017). En este proyecto, se obtuvo para *Listeria monocytogenes* una CMI de 5 mg/mL, menor a la que reporta dicha investigación, pero lo más interesante es que fue obtenida en un medio alternativo M2 con base de suero de leche y jarabe de maguey en su formulación. Lo que respecta al MRS, nosotros obtuvimos una CMI 20 mg/mL, el doble a la que ellos reportan. Sin embargo, para el caso de *Staphylococcus aureus*, la CMI obtenida en este proyecto de 80 mg/mL es mayor a la reportada en su trabajo de investigación, utilizando el mismo medio de cultivo MRS para el desarrollo de la BAL. Cabe mencionar, hay escasas publicaciones que relacionen para el género de *Enterococcus* en medios formulados que contengan aguamiel, miel o jarabe de maguey y/o agave con propósito de producción de bacteriocinas, entre lo reportado se encuentra el uso de fructooligosacáridos (comerciales) con cepas como *Enterococcus durans* l28-1 y *Enterococcus faecium* MR006, entre otras BAL para analizar los efectos de estos oligosacáridos y otros tipos de carbohidratos en el crecimiento y la producción de bacteriocinas, donde se obtuvo que para las cepas *Lac. animalis* C060203, *E. durans* L28-1 y *E. faecium* MR006 se obtuvo un mayor número de células con dextrosa, aunque una mayor producción de bacteriocinas con los fructooligosacáridos, aunque esta producción fue menor en comparación con otras cepas empleadas en dicho experimento como *L. lactis* ssp., *Lactis* C101910 y *lactococcus* sp. GM005, aunque no mencionan contra que microorganismos patógenos realizaron su prueba antimicrobiana (Chen et al., 2007). Sin embargo, entre lo poco reportado, la mayoría es sobre la inulina de fuentes como agave y achicoria, principalmente, para efectos de capacidad probiótica de esta cepa y otras como *Lactobacillus salivarius* (Ayala-Monter et al., 2018), con bacterias ácido lácticas como *P. pentosaceus* y *A. viridans* como fuentes de C para la producción de ácidos grasos de cadena corta (Díaz-Vela et al., 2012) o de aislamiento de cepas de aguamiel de *Agave salmiana* para estudiar su capacidad probiótica (Castro-Rodríguez, 2013).

6.4.- Conclusiones

Con relación a desarrollo, consumo de azúcares totales y actividad antimicrobiana de la bacteria ácido-láctica, *Enterococcus faecium*, aislada de queso Cotija, un queso de origen mexicano, en el progreso de esta investigación se concluye lo siguiente:

- En fermentaciones realizadas a nivel laboratorio en condiciones de reposo a 37 °C, se demostró que los medios alternativos propuestos en esta investigación a base de suero de leche con melaza y/o suero de leche con jarabe de maguey, permitieron el crecimiento de la BAL *Enterococcus faecium* con la producción de sustancias con actividad antimicrobiana BLIS, principalmente con actividad anti-listerial, lo que conlleva a que estos medios de cultivo sean una posibilidad de sustitución de medios de cultivo estándar como el caldo MRS, que tienen costos elevados que inciden en incrementos en los procesos de producción de péptidos antimicrobianos.
- El consumo de carbohidratos fue muy parecido entre los tres medios utilizados.
- Tanto el medio M1 y M2 producen BLIS, la cual tiene diferente CMI contra las bacterias indicadoras.

6.5.- Referencias bibliográficas

- Abo-Amer, A. E. (2010). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61(3), 445-452. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0157-6>
- Aguilar-Galvez, A., Guillermo, S., Dubois-Dauphin, R., Campos, D., & Thonart, P. (2011). The influence of growth conditions on enterocin-like production by enterococcus faecium CWBI-B1430 and enterococcus mundtii CWBI-B1431 isolates from artisanal Peruvian cheeses. *Annals of Microbiology*, 61(4), 955-964. <https://doi.org/10.1007/s13213-011-0219-4>
- Alcocer, S. A. H., Corona, C., & Zapata, J. (2014). Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas. *Revista bio ciencias*, 3(1), 4-16. <http://revistabiociencias.uan.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/109/84>
- Alvarado, C. J., García-Almendárez, B. E., Martin, S. E., & Regalado-González, C. (2005). Anti-*Listeria monocytogenes* Bacteriocin-Like inhibitory substances from enterococcus faecium UQ31 isolated from artisan Mexican-Style cheese. *Current Microbiology*, 51(2), 110-115. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4549-y>
- Ankaiah, D., Esakkiraj, P., Venkatesh, P., Ayyanna, R., & Arul, V. (2017). Probiotic characterization of *Enterococcus faecium* Por1: cloning, over expression of Enterocin-A and evaluation of antibacterial, anti-cancer properties. *Journal of Functional Foods*, 38, 280-292. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.034>
- Arzola-Sotelo, E. A. (2013). *Aplicación de la teoría de modelos múltiples en la evaluación del crecimiento individual del chano (Micropogonias megalops, Gilbert 1890) en el norte del Golfo de California*. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/123456789/368/1/arzola_e.pdf
- Ayala-Monter, M. A., Fernández-De Gatta Sánchez, D., Pinto-Ruíz, R., González-Muñoz, S. S., Bárcena-Gama, J. R., Hernández-Mendo, O., & Torres-Salado, N. (2018). Efecto prebiótico de dos fuentes de inulina en el crecimiento in vitro de *Lactobacillus salivarius* y enterococcus faecium. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 9(2), 346. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v9i2.4488>
- Bali, V., Panesar, P. S., & Bera, M. B. (2014). Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36(2), 204-214. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.947916>
- Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W. J., Vera, H., & Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la*

-
- Universidad del Zulia, 18(5), 582-588.
<https://www.redalyc.org/pdf/959/95918509.pdf>
- Castro-Rodríguez, D. C. (2013). *ESTUDIO DE LA CAPACIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS DE BACTERIAS LÁCTICAS AISLADAS DE Agave salmiana* sp. [Tesis de maestría]. Instituto Politécnico Nacional.
- Chen, Y., Srionnual, S., Onda, T., & Yanagida, F. (2007). Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 45(2), 190-193.
<https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.2007.02167.x>
- Choi, H. Y., Kim, J. S., & Kim, W. J. (2011). Optimization of conditions for the maximum bacteriocin production of enterococcus faecium DB1 using response surface methodology. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31(2), 176-182. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.2.176>
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J., Ruíz-Terán, 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(8), 4367-4374. <https://doi.org/10.1128/aem.69.8.4367-4374.2003>
- Díaz-Vela, J., Mayorga-Reyes, L., Totosa S., A., & Pérez-Chabela, M. L. (2012). Parámetros cinéticos y perfil de ácidos grasos de cadena corta de bacterias ácido lácticas termotolerantes con diferentes fuentes de carbono. *Vitae-revista De La Facultad De Química Farmaceutica*, 19(3), 253-260.
<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169825291003.pdf>
- Dinçer, E., & Kivanç, M. (2021). In vitro evaluation of probiotic potential of Enterococcus faecium strains isolated from Turkish pastırma. *Archives of Microbiology*, 203(6), 2831-2841. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02273-y>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Elotmani, F., Revol-Junelles, A., Assobhei, O., & Millière, J. (2002). Characterization of anti- listeria monocytogenes bacteriocins from Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, and Lactococcus lactis strains isolated from raïb, a Moroccan traditional fermented milk. *Current Microbiology*, 44(1), 10-17. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0067-8>
- Escalante, M. (2023). *Bioprospección de novedosos exopolisacáridos y plásticos haloarqueales Acumulados por haloferax mucosum: producción, caracterización química y macromolecular*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo].
-

-
- Fugaban, J. I. I., Bucheli, J. E. V., & Holzapfel, W. H. (2021). Characterization of partially purified bacteriocins produced by enterococcus faecium strains isolated from soybean paste active against listeria spp. and Vancomycin-Resistant enterococci. *Microorganisms*, 9(5), 1085. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051085>
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Sood, S. K., Kumar, A., & Kapila, S. (2013). Bacteriocin production and different strategies for their recovery and purification. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 6(1), 47-58. <https://doi.org/10.1007/s12602-013-9153-z>
- Gupta, H., Malik, R. K., Bhardwaj, A., Kaur, G., De, S., & Kaushik, J. K. (2010). Purification and characterization of enterocin FH 99 produced by a faecal isolate enterococcus faecium FH 99. *Indian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s12088-010-0039-4>
- Hajikhani, R., Darilmaz, D. Ö., Yüksekdağ, Z. N., & Beyatlı, Y. (2021). Assessment of some metabolic activities and potential probiotic properties of eight enterococcus bacteria isolated from white cheese microbiota. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(8), 1259-1274. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01599-3>
- Jahansepar, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, M., & Rezaee, M. A. (2019). Comparative analysis of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium strains isolated from clinical samples and traditional cheese types in the northwest of Iran: antimicrobial susceptibility and virulence traits. *Archives of Microbiology*, 202(4), 765-772. <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01792-z>
- Jawan, R., Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Mustafa, S., Halim, M., & Ariff, A. (2020). Influence of culture conditions and medium compositions on the production of Bacteriocin-Like inhibitory substances by Lactococcus lactis GH1. *Microorganisms*, 8(10), 1454. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101454>
- Khelissa, S., Chihib, N., & Gharsallaoui, A. (2020). Conditions of Nisin production by Lactococcus lactis subsp. lactis and its main uses as a food preservative. *Archives of Microbiology*, 203(2), 465-480. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>
- Lee, J. S., Park, S. W., Lee, H. B., & Kang, S. (2021). Bacteriocin-Like Inhibitory Substance (BLIS) activity of enterococcus faecium DB1 against biofilm formation by clostridium perfringens. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(5), 1452-1457. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09813-4>
- Meier-Kolthoff, J. P., Carbasse, J. S., Peinado-Olarte, R. L., & Göker, M. (2021). TYGS and LPSN: a database tandem for fast and reliable genome-based classification and nomenclature of prokaryotes. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D801-D807. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab902>
- Moreira, N. L., Santos, L. F. D., Soccol, C. R., & Suguimoto, H. H. (2015). Dynamics of ethanol production from deproteinized whey by Kluyveromyces Marxianus: An analysis about buffering capacity, thermal and nitrogen tolerance. *Brazilian Archives*

-
- of Biology and Technology*, 58(3), 454-461. <https://doi.org/10.1590/s1516-8913201500372>
- NEUROtiker. (s/f-a). Wikimedia.org. Recuperado el 1 de noviembre de 2023, de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c6/Alpha-D-Glucopyranose.svg>
- NEUROtiker. (s/f-b). Wikimedia.org. Recuperado el 1 de noviembre de 2023, de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1a/Saccharose2.svg>
- Orozco-Álvarez, C., Molina-Carbajal, E., Megchun-Díaz, J., Osorio-Mirón, A., & Robles-Martínez, F. (2019). DESARROLLO DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA EL BIOSECADO DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS EN PILAS. *Revista Internacional De Contaminacion Ambiental*, 35(esp02), 79-90. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.esp02.08>
- Parascanu, M., Sánchez, N., Sandoval-Salas, F., Carreto, C. M., Soreanu, G., & Sánchez-Silva, L. (2021). Environmental and economic analysis of bioethanol production from sugarcane molasses and agave juice. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(45), 64374-64393. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15471-4>
- Pérez-Arauz, Á., Rodríguez-Hernández, A., López-Cuellar, M., Martínez-Juárez, V., & Chavarría-Hernández, N. (2020). Films based on pectin, gellan, EDTA, and bacteriocin-like compounds produced by *Streptococcus infantarius* for the bacterial control in fish packaging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15006>
- Qiao, X., Du, R., Wang, Y., & Han, Y. (2019). Isolation, characterisation and fermentation optimisation of Bacteriocin-Producing enterococcus faecium. *Waste and Biomass Valorization*, 11(7), 3173-3181. <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00634-9>
- Ramírez-Barrera, G. (2011). *Desarrollo y validación de modelos predictivos dinámicos del crecimiento de Staphylococcus aureus en productos cárnicos previo al proceso de cocción*. [Tesis de maestría]. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Rathod, N. B., Nirmal, N. P., Pagarkar, A. U., Özoğul, F., & Rocha, J. M. (2022). Antimicrobial impacts of microbial metabolites on the preservation of fish and fishery products: A review with current knowledge. *Microorganisms*, 10(4), 773. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040773>
- Sánchez-Reyes, W. Y. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria alimentaria, mediante el cultivo de la bacteria ácido-láctica, Streptococcus infantarius, en medios complejos que contienen melazas* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Schirru, S., Favaro, L., Mangia, N. P., Basaglia, M., Casella, S., Comunian, R., Fancello, F., De Melo Franco, B. D. G., De Souza Oliveira, R. P., & Todorov, S. D. (2013). Comparison of bacteriocins production from enterococcus faecium strains in cheese
-

-
- whey and optimised commercial MRS medium. *Annals of Microbiology*, 64(1), 321-331. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0667-0>
- Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S. L., De Souza, C. K., & De Carvalho, L. F. (2018). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2839-2849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1474852>
- Sosa, F. M., Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2021). Utilization of Agro-Industrial byproducts for bacteriocin production using enterococcus spp. strains isolated from Patagonian marine invertebrates. *Current Microbiology*, 79(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02712-5>
- Strateva, T., Dimov, S., Atanasova, Д., Petkova, V., Savov, E., & Mitov, I. (2015). Molecular genetic study of potentially bacteriocinogenic clinical and dairy enterococcus Spp. isolates from Bulgaria. *Annals of Microbiology*, 66(1), 381-387. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1120-3>
- Timin. (s/f). Wikimedia.org. Recuperado el 1 de noviembre de 2023, de <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/1a/FOS.svg>
- Trejo-González, L. (2021). *Investigación acerca de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de quesos artesanales, con potencial biotecnológico*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Wang, S., Tian, R., Liu, B., Wang, H., Li, J., Li, C., Li, M., Evivie, S. E., & Li, B. (2021). Effects of carbon concentration, oxygen, and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01257-x>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yikrazuul. (s/f). Wikimedia.org. Recuperado el 1 de noviembre de 2023, <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6b/Beta-D-Lactose.svg>
- Ziadi, M., M'hir, S., Aydi, A., & Hamdi, M. (2020). Bioreactor Scale-Up and Kinetic modeling of lactic acid and biomass production by *Enterococcus faecalis* SLT13 during batch culture on hydrolyzed cheese whey. *Journal of Chemistry*, 2020, 1-9. <https://doi.org/10.1155/2020/12367>
-

7.-Capítulo III

Streptococcus infantarius

7.1.- Introducción

El género *Streptococcus* incluye varias especies, notablemente diferentes en su comportamiento, aplicaciones, virulencia y seguridad. Taxonómicamente *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* perteneciente al grupo *Streptococcus bovis*, que incluye varias especies de patógenos, sin embargo, se ha encontrado como especie predominante en algunos productos lácteos africanos que son ampliamente consumidos y considerados seguros. *Streptococcus infantarius subsp. infantarius* es una BAL reportada por primera vez en la literatura científica por Bouvet et al. (1997). Se caracteriza por ser un coco Gram positivo, que se presenta en pares o en cadenas cortas; las células son inmóviles, facultativamente anaerobios, no esporulados y catalasa negativa. Cuando se cultivan en agar sangre, las colonias son circulares, de 1 mm de diámetro y con actividad α -hemolítica. El crecimiento mejora en una atmósfera de 5% de CO₂. *S. infantarius* y *S. gallolyticus* son especies dominantes a nivel mundial en el microbiota de los productos alimentarios que han sido fermentados, especialmente en aquellos que se fermentan de manera espontánea. Pero, aunque la mayoría de *Streptococcus* spp. se identifican como bacterias patógenas, especies como *S. thermophilus* son consideradas una bacteria “generalmente reconocida como segura” (GRAS) por la FDA (Food and Drug Administration) y usada para la producción de alimentos a nivel industrial (Dos Santos et al., 2020; García-Curiel, López-Cuellar et al., 2021; Özkan et al., 2021).

Las bacteriocinas producidas por *Streptococcus* pueden tener aplicaciones atractivas debido a su potencial espectro antimicrobiano, posiblemente en ramas como la biomedicina. Las mutacinas que son péptidos antimicrobianos de clase I (residuos de lantionina) y clase II (aminoácido no modificado) producidos por la bacteria *Streptococcus mutans* y que representa casi el 40 % de las bacteriocinas que se han purificado y caracterizado a partir de especies de *Streptococcus*. Estos péptidos tienen un amplio espectro antibacteriano y tienen aplicaciones farmacológicas potenciales (García-Curiel et al., 2021).

7.2.- Materiales y métodos

7.2.1.- Microorganismos

- *Streptococcus infantarius* (*S. infantarius*), aislada del Pozol y proporcionada por las Dras. Carmen Wachter Rodarte y Gloria Díaz Ruiz de la Facultad de Química de la UNAM (Mendoza-Mendoza, 2012). *S. infantarius* fue conservada en viales de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo MRS) a -72 °C (Ultracongelador REVCO). Para su activación, se descongeló un vial con el cual se inocularon 5 mL de caldo de Man-

Rogosa-Sharpe (MRS) estéril (1% v/v), dándole un periodo de incubación de 24 h a 37°C.

- *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), proporcionada por el Laboratorio estatal de salud pública del estado de Hidalgo y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ATCC-25923, ambas conservadas a -72 °C (Ultracongelador REVCO) cada una en viales de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo BHI). Para su activación, se descongeló un vial y en 5 mL de caldo BHI estéril se inoculó (1% v/v), dando un periodo de incubación de 24 h a 35°C.

7.2.2.- Medios de cultivo

Para la preparación de viales de conservación y activación de microorganismos se usó caldo de Man-Rogosa-Sharpe para la BAL y caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* ATCC-25923.

Para las fermentaciones se usaron los siguientes medios de cultivo:

- 1) Caldo de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) (BD™ DIFCO, Francia).
- 2) Medio 1 (M1): Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon® México) 5 g/L, extracto de carne (BD Bioxon® México) 10 g/L, extracto de levadura (BD Bioxon® México) 5 g/L, melaza (Ingenio azucarero: San José de Abajo, Veracruz, México. Zafra 2021-2022) 5 g/L, pharmamedia (Traders Protein, USA.) 1g/L, proflo (Traders Protein, USA.) 1g/L, suero de leche en polvo (Food Technologies Trading S.A. de C.V, México) 15 g/L y Tween 80 (Hycel, México) 1g/L.
- 1) Medio 2 (M2): Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon® México) 5 g/L, extracto de carne (BD Bioxon® México) 10 g/L, extracto de levadura (BD Bioxon® México) 5 g/L, jarabe de maguey (Botánica tradicional, México) 5 g/L, Pharmamedia (Traders Protein, USA.) 1g/L, Proflo (Traders Protein, USA.) 1g/L, suero de leche en polvo (Food Technologies Trading S.A. de C.V, México) 15 g/L y Tween 80 (Hycel, México) 1g/L.

7.2.3.- Reactivos químicos:

Hidróxido de sodio (NaOH) (Química Meyer, México), fenol, ácido sulfúrico concentrado (H₂SO₄) (J.T. Baker®, México), Cloruro de sodio (NaCl) (J.T. Baker®, México), Nisaplin® (N) (DANISCO, Reino Unido).

7.2.4.- Metodología para la producción de *Streptococcus infantarius*

Se prepararon 500 mL de caldo MRS según indicaciones del fabricante, M1 y M2 se y se ajustó el pH (Microprocesador Hanna pH 211) a uno cercano a 7 con NaOH 5 M.

Posteriormente se inocularon con la cepa de *S. infantarius* (1% v/v) con 24 h de activación (Figura 14). Una vez inoculado el medio de cultivo a utilizar, se homogenizó y distribuyó en

tubos de centrifuga de 50 mL (Corning®) estériles hasta los 40 mL de capacidad, mismo que fue incubado (Sheldon, GI6) a 37°C, sin agitación durante 24 h. Los experimentos fueron hechos por duplicado.

Durante la cinética de fermentación, se tomaron 2 tubos de centrifuga, considerando los tiempos para muestrear y procesar cada par de tubos desde el tiempo de 0 h, continuando con los tiempos 3, 6, 9, 12 h y concluyendo con el tiempo 24 h. A dicho par de tubos se le realizó durante el procesamiento de muestras en la cinética la medición de pH, densidad óptica, concentración de biomasa y a los sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos la actividad antimicrobiana y la determinación de azúcares totales por el método de fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956).

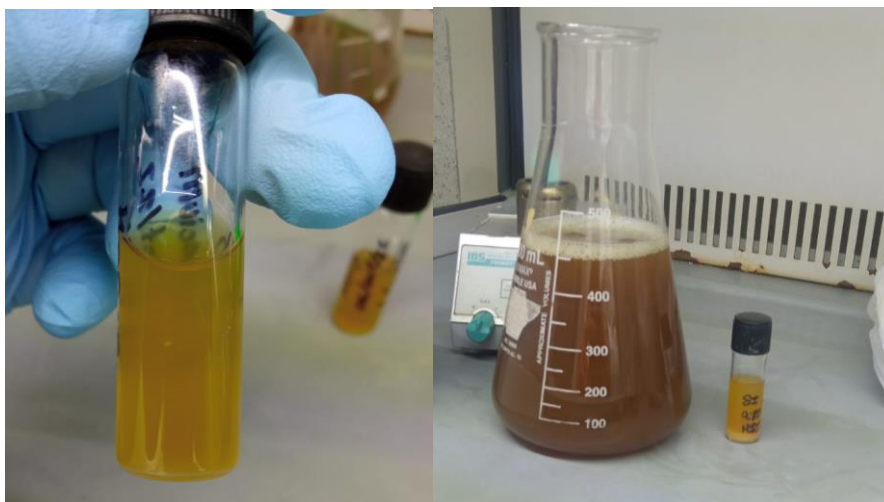


Figura 13 Matraz inoculado con *Streptococcus infantarius*.

7.2.5.- Concentración de biomasa

Muestras de 40 mL de cada tiempo evaluado fueron inicialmente cometidas a un tratamiento térmico (1024 Shaking Water Bath Foss Tecator) a 80°C por 10 min y posteriormente centrifugadas a 6000 rpm, 4°C durante 20 min (Centrifuga refrigerada Hermle Z323K), al pellet de biomasa obtenido se le realizaron dos lavados con solución NaCl (0.9 % p/v) y se centrifugaron a 6000 rpm, 4°C durante 15 min. Posteriormente el pellet obtenido se llevó a peso seco (100 °C, 24 h) en un horno de convención (Drying Oven DHG-9075A).

La concentración de biomasa se calculó usando la siguiente ecuación:

$$x = ((Pt + x) - Pt)/Vm \quad (1)$$

Donde x es la concentración de biomasa (g/L). Pt es el peso del tubo (g), $Pt+x$ es el peso del tubo más biomasa (g) y Vm el volumen de la muestra (L). Esos datos se graficaron en

función del tiempo. El sobrenadante libre de células (SLC) se conservó para ensayos de la actividad antimicrobiana (AaM) y el contenido de azúcares totales.

Es importante mencionar que uno SLC de cada tiempo evaluado le fue ajustado el pH entre 6.5 a 7 con NaOH 5 M y el otro se dejó con el pH indicado en la medición según el tiempo que corresponde (Sánchez-Reyes, 2014)

7.2.6.- Determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956)

Para la cuantificación del consumo de azúcares totales durante la fermentación por *Streptococcus infantarius* en los medios de cultivo MRS, M1 y M2 se utilizó el método fenol-sulfúrico (Dubois et al., 1956; Escalante, 2023), para ello se utilizó un espectrofotómetro Génesis 10 UV-VIS®, para las lecturas de absorbancia correspondientes. La concentración de azúcares totales fue determinada utilizando curvas de calibración de glucosa con ecuación $y = 8.98x - 0.0005$ ($R^2=0.9996$), y $y = 7.2371x - 0.0155$ ($R^2=0.9974$) (Ver “Anexo III”). Todos los ensayos y medidas se realizaron por cuatuplicado.

7.2.7.- Cálculo de parámetros cinéticos de crecimiento

Las fases de crecimiento microbiológico con mayor interés corresponden a las tres primeras que son: adaptación, exponencial y estacionaria, dado que en ellas ocurren los mayores problemas de interés microbiano como la producción de ciertos metabolitos, cambios en las características de los alimentos, producción de toxinas, etc. Considerando estas fases de la curva, el crecimiento mostrado presenta una forma sigmoideal, de allí que los modelos desarrollados y aplicados sean para ajustarse a dicha forma (Castro et al., 2008).

7.2.7.1.- Determinación de velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}} h^{-1}$)

El modelo de Gompertz fue el primer modelo en ciencia actuarial utilizado para ajustar un modelo a los datos de mortalidad humana, y esta ecuación básica se considera la ecuación más utilizada para describir el crecimiento microbiano en los alimentos en condiciones ambientales controladas y definidas. Esta función se basa en la relación exponencial entre una tasa de crecimiento determinada y la densidad de población. Se pueden crear modelos secundarios a partir de este modelo (Arzola-Sotelo, 2013; Castro et al., 2008).

$$y(t) = A + C \exp\left[-\exp\left(\frac{-(t-M)}{B}\right)\right] \quad (2)$$

Donde: y cuenta microbiana al tiempo t . A , C , M , B son los parámetros de ajuste del modelo. A inóculo inicial, C diferencia entre la población inicial y final, B velocidad de crecimiento relativa, M tiempo al cual se da B en horas (Ramírez-Barrera, 2011).

En este trabajo para determinar la tasa de crecimiento máxima se estimó mediante regresión no lineal de los datos de biomasa (x) ajustados al modelo de Gompertz de 4 parámetros, utilizando el software SigmaPlot 14:

$$y(t) = y_0 + a * \exp[-\exp(-\frac{(t-x_0)}{b})] \quad (3)$$

Donde: $y(t)$ cuenta microbiana al tiempo t (h); x_0 , y_0 , a , b son los parámetros de ajuste del modelo generados en el software mediante regresión no lineal.

El valor de $\mu_{\max}$ (h^{-1}) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{d}{dt} x(t)\right) \cdot \frac{1}{x(t)} \quad (4)$$

7.2.7.2.- Determinación de la velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales).

La ecuación que describe el consumo de azúcares totales durante la cinética es sigmoideal de 4 parámetros, utilizando el software SigmaPlot 14 y es la siguiente:

$$y(t) = y_0 + \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{t-c_0}{b}\right)} \quad (5)$$

Donde a , b , c_0 son los parámetros de ajuste del modelo mediante regresión no lineal de los datos de azúcares totales (c); y_0 contenido de inicial de azúcares totales; t es el tiempo (Orozco-Álvarez et al., 2019).

El valor de q_s ($h^{-1}g^{-1}x$) se estimó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{d}{dt} c(t)\right) \cdot \frac{1}{x(t)} \quad (6)$$

7.2.7.3.- Rendimiento

El rendimiento biológico (g biomasa/g azúcares totales), se determinó utilizando la siguiente ecuación.

$$Y_{xs} = \frac{X_{m\acute{a}x} - X_0}{(S_0 - S_f)} \quad (7)$$

Donde $X_{m\acute{a}x}$ es la máxima biomasa obtenida experimentalmente; X_0 es la concentración inicial de biomasa; S_0 la concentración inicial de azúcares totales, y S_f la concentración final de azúcares totales (Orozco-Álvarez et al., 2019).

7.2.8.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop-ND1000

Para la detección de proteínas solubles en el NanoDrop-ND1000, se utilizaron el SLC obtenido de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 de la cinética de fermentación y los medios MRS, M1 y M2 estériles y no inoculados. Estos fueron concentrados primero en un SpeedVac Savant SPD2010 en una relación de 5 mL de muestra a 1 mL (Figura 15). Después de una dilución 1:4 con agua destilada estéril, estos concentrados se procesaron de acuerdo con las instrucciones de uso del dispositivo NanoDrop-ND1000. Luego de obtener la lectura (280 nm), se utiliza el factor de dilución para corregirla.



Figura 14 Concentrados en SpeedVac de SLC para posterior determinación de proteína en NanoDrop.

7.2.9.- Concentración mínima inhibitoria (CMI) contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*:

La determinación MIC se hizo en microplacas (Corning® Costar®), acorde a la metodología de Wiegand et al. (2008).

En lo que corresponde al microorganismo indicador, fue tratado de la siguiente manera:

L. monocytogenes y *S. aureus* fue inoculado (1% v/v) en 5 mL de medio BHI estéril y colocado a incubar (Sheldon GI6) a 35°C durante 24 h, pasado este tiempo, se realizó una resiembra nuevamente con 50 µL de suspensión bacteriana ya activa en 5 mL de caldo BHI estéril, nuevamente, se incubó a 35°C durante 6 h, dependiendo el microorganismo indicador patógeno, se obtienen diferentes concentraciones al finalizar las 6 h, mostradas en la Tabla 5.

Transcurridas las 6 h, todos los microorganismos se diluyeron hasta concentraciones del orden 10^5 UFC/mL, mediante diluciones base 10, utilizando solución isotónica (0.9 % p/v NaCl) como diluyente (Pérez-Arauz et al., 2021).

La concentración de biomasa microbiana inicial (X_0) fue de 5 log CFU/mL, los medios de cultivo fueron BHI para *L. monocytogenes* y *S. aureus*. El volumen de líquido por pocillo en placa fue de 220 μ L. Las placas fueron incubadas a 35°C, 120 rpm durante 24 h en una incubadora con agitación orbital (Barnstead Lab-Line MAX Q 5000, Thermo Scientific) con lecturas de absorbancia (545 a 630 nm) a las 0,18 y 24 h con un Stat Fax 2100 (Awareness Technology Inc., FL, EE.UU.). Se incluyeron dos tipos de controles: control biótico (medios de cultivo inoculados con el microorganismo, pero sin los CFS de las fermentaciones o N); control abiótico (medio de cultivo estéril, pero sin microorganismo). Los experimentos fueron realizados por triplicado (Tabla 6) (Trejo-González, 2021).

Tabla 5 Concentraciones alcanzadas a las 6 h de incubación para los 2 microorganismos indicadores usados (Trejo-González, 2021).

Microorganismo Indicador	UFC/mL
<i>L. monocytogenes</i>	8.3×10^8
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	5.6×10^8

Tabla 6 Concentración de proteína de sobrenadantes libres de células (SLC) y controles, empleados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Streptococcus infantarius*.

Microorganismo indicador	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Control/ SLC	Concentraciones empleadas (mg/mL)	
Nisina	5,10,15,20,40,160	20,40,80,100,120,160
MRS	20,35	35
M1	40	15,20,35,40
M2		
SLC T0	5,10,15,20,35,40	20, 24, 33, 40
SLC T3		
SLC T6		
SLC T9		
SLC T12		
SLC T24		

MRS De Man Rogosa-Sharpe, ^{M1} Medio de cultivo alternativo No.1, ^{M2} Medio de cultivo alternativo No.2

7.10.- Análisis estadístico de las CMI

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el análisis de varianza en SPSS v.25.00 (Chicago, Illinois, EE. UU.). Las medias con una diferencia significativa se compararon mediante pruebas de comparación de medias mediante HSD Tukey. Los valores $p > 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos.

7.3.- Resultados y discusiones

El parámetro monitoreado durante la cinética de crecimiento fue el pH. Porque se considera que tiene un efecto significativo en la producción de bacteriocinas, ya que afecta directamente la actividad enzimática de los microorganismos, por tanto, el crecimiento celular y la producción de diversos metabolitos, incluidas las bacteriocinas. Esto debido, a sus mecanismos de regulación de la producción, donde su acción depende, entre otras cosas, del pH (Sidooski et al., 2018). La figura 15, muestra el comportamiento de acidificación del medio de cultivo que se produce en los 3 medios de cultivo utilizados: MRS, M1 y M2.

En el transcurso de la cinética se dio seguimiento al comportamiento del pH haciendo el registro de las lecturas. Con base a lo anterior, se puede apreciar que los registros al paso del tiempo muestran una clara acidificación durante el crecimiento de la BAL en cada uno de los medios de cultivo, sin embargo, las formulaciones de medio de cultivo sugeridas no acidifican a los límites alcanzados en el medio control. MRS alcanzó un pH de 4.41 ± 0.028 , mientras que los medios M1 y M2 tienen pH promedio de 5.26 ± 0.106 y 4.80 ± 0.063 , respectivamente. Lo anterior, puede deberse a que los medios alternativos M1 y M2 contienen en sus formulaciones suero de leche, donde la proteína del mismo se considera que posee una alta capacidad amortiguadora (Moreira et al., 2015). Nuestro grupo de investigación ha reportado para esta cepa pH alcanzados en diferentes cinéticas con distintos medios de cultivo, aunque con otras condiciones, por ejemplo, en medio MRS, 30 °C a 130 rpm se reportan a las 24 h pH cercano a 4.75 (García-Curiel, 2021). En el medio II (medio APT enriquecido al 1% con lactosuero en polvo) a condiciones de operación de 30°C y 150 rpm se reporta a las 9 h de fermentación pH de 4.5 (López-Ortega, 2014). En un medio propuesto anteriormente (medio MMP con 4% p/v de melaza) a condiciones de fermentación de 30°C a 200 rpm se reportan para las 9 h un pH de 4.1 (Sánchez-Reyes, 2014). Cabe mencionar que los trabajos realizados en el año 2014 fueron en biorreactor.

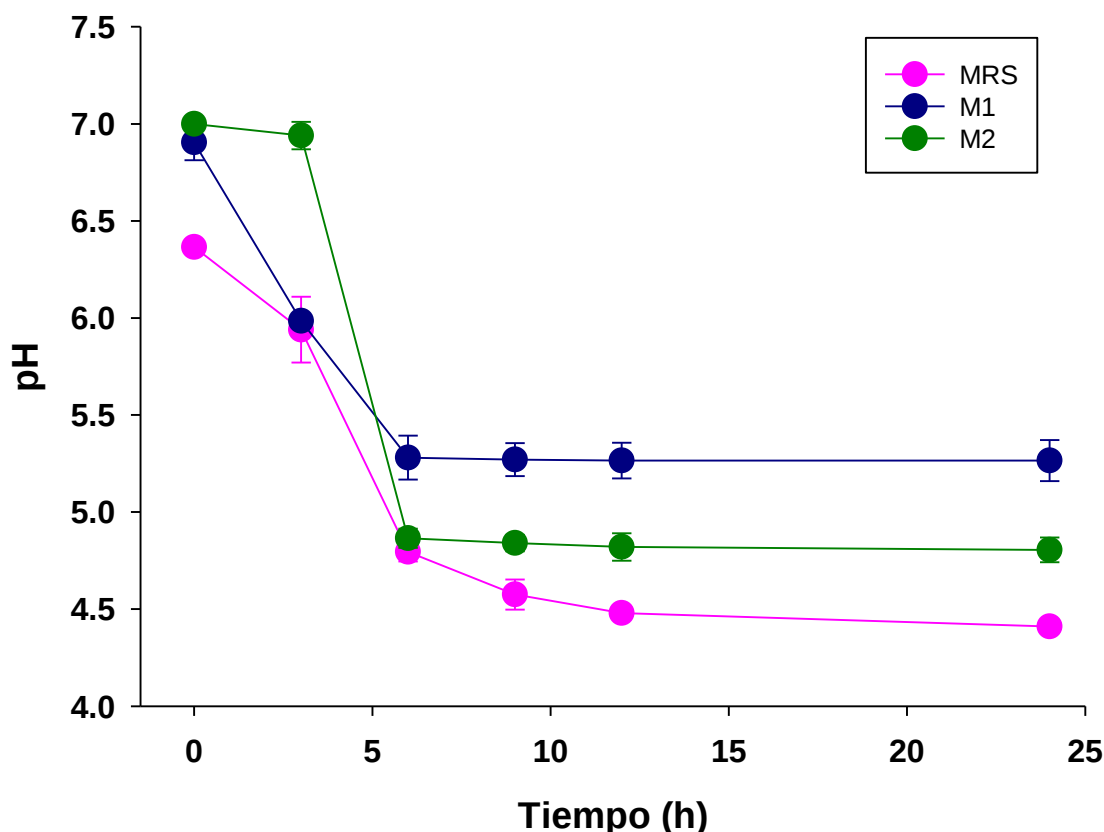


Figura 15 Evolución del pH durante la cinética de crecimiento de *Streptococcus infantarius* en MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos M1(suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey) en condiciones de reposo a 37°C.

7.3.2.- Concentración de biomasa

La Figura 16 indica el comportamiento de crecimiento de *Streptococcus infantarius* en los 3 medios de cultivo empleados con diferentes fuentes de carbono mediante la concentración de biomasa. En la figura se puede notar como las formulaciones de medios de cultivo sugeridas en este proyecto tienen mejores rendimientos de biomasa comparadas con un medio de cultivo estándar comercial (MRS). Ahora bien, las concentraciones máximas de biomasa obtenidas en el medio MRS fueron $1.016 \text{ g/L} \pm 0.041$, en el medio M1 $1.570 \text{ g/L} \pm 0.092$ y en M2 $1.488 \text{ g/L} \pm 0.509$, posicionando con mejores rendimientos de biomasa generadas a estos dos últimos. En este análisis, las muestras obtenidas fueron “corregidas” con un tubo procesado como lo indica la metodología, con medio de cultivo alternativo sin inocular. El resultado que arroja la determinación de la concentración de biomasa, primeramente, es el comportamiento de crecimiento de la BAL, sin embargo, también permite visualizar la capacidad que tuvo la bacteria para desarrollarse en el medio en cuestión. Por ello, aunque el medio MRS es un medio estándar de uso en laboratorios para

su crecimiento, los medios sugeridos en este proyecto tuvieron resultados bastante interesantes, por el hecho de contener en su formulación productos y subproductos de la agroindustria en México como la melaza de caña de azúcar, el suero de leche y el jarabe de maguey (Ver “Materiales y Métodos”).

De acuerdo con lo reportado en condiciones distintas de operación de 30°C, 200 rpm en un medio propuesto anteriormente (medio MMP con 4% p/v de melaza) se alcanza una concentración de biomasa máxima desde las 6 h de 1.17 g/L (Sánchez-Reyes, 2014). Dado que la producción de bacteriocinas está asociada con el crecimiento celular porque la producción ocurre durante la fase exponencial media y aumenta para alcanzar un nivel máximo al final de la fase exponencial o al comienzo de la fase estacionaria temprana (Abo-Amer, 2010), es importante monitorear el crecimiento de la BAL, para notar el soporte del crecimiento bacteriano en los medios propuestos sin ver afectada su producción de biomasa.

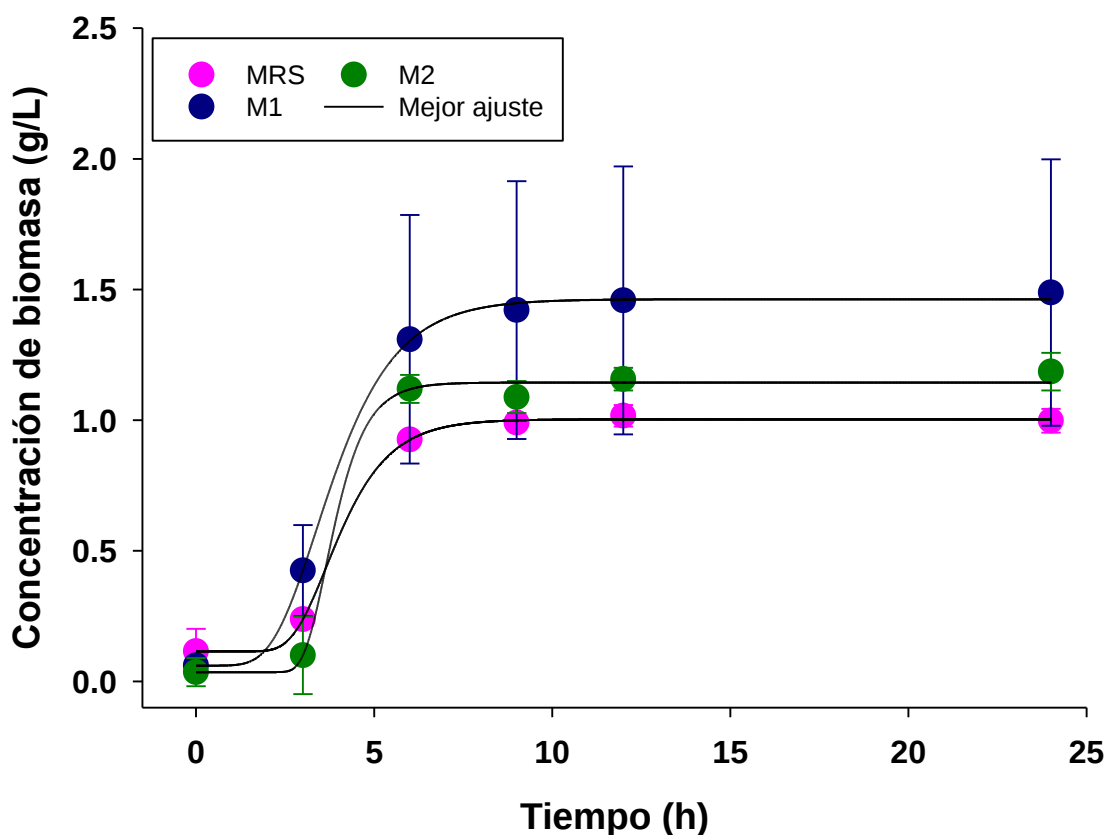


Figura 16 Perfil de fermentación de crecimiento de *Streptococcus infantarius* (g/L) durante 24 h en condiciones de reposo a 37°C en medio MRS (medio estándar comercial) y medios

alternativos M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).

En la figura 17 se presentan las cinéticas de consumo de la fuente de C, determinadas mediante la prueba de azúcares totales, con ello, se denota que, en los 3 medios de cultivo empleados, solo uno tuvo un consumo total de azúcares mayor del 50% mientras que, en los demás medios de cultivo, este porcentaje no fue alcanzado. *Streptococcus infantarius* tuvo un consumo de azúcares totales iniciales de $20.446 \text{ g/L} \pm 1.515$ a $6.339 \text{ g/L} \pm 1.782$ finales, que es un aproximado del 68.9 % consumido en el medio de cultivo MRS, para el M1 los azúcares totales iniciales fueron de $17.272 \text{ g/L} \pm 1.370$ hasta $11.503 \text{ g/L} \pm 3.774$ al final de la cinética, dando un consumo aproximado del 33.4 %. Por último, en lo que refiere al M2, los azúcares iniciales del medio fueron $18.266 \text{ g/L} \pm 0.742$, finalizando en $11.278 \text{ g/L} \pm 2.639$ dando un consumo aproximado del 38.2%. De acuerdo con reportes para la BAL *Lactobacillus acidophilus* AA11 por (Abo-Amer, 2010) en prueba de diez fuentes de carbono: sacarosa, glucosa y lactosa fueron fuentes de carbono ideales para el crecimiento bacteriano. En este sentido, el medio MRS tiene en su composición la glucosa como principal fuente de C, el M1 tiene una combinación de lactosa y sacarosa, al tener como fuentes de C el suero de leche y la melaza de caña de azúcar, principalmente (Bali et al., 2016; Parascanu et al., 2021). El M2 tiene en lugar de melaza de caña de azúcar, la combinación de suero de leche con jarabe de maguey, donde las principales fuentes de C serían la lactosa y los fructooligosacáridos (Alcocer et al., 2014; Bali et al., 2014). El origen de la cepa es sumamente importante y valioso, dado que *Streptococcus infantarius* es aislada del Pozol. La cual es una bebida consumida en el sureste de México, obtenida de la fermentación no alcohólica del maíz nixtamalizado (cocido con cal), de gran importancia nutricional, cultural y económica. Pero en cuanto a lo que refiere a la fuente de carbono sustancial, el almidón es el principal carbohidrato disponible en el maíz nixtamalizado. Ahora bien, *Streptococcus infantarius* se han identificado como una bacteria amilolítica del ácido láctico, además de otros géneros como *Enterococcus*, *Lactococcus*, donde *S. infantarius* tiene la mayor tasa de crecimiento específico sobre almidón, pero con baja actividad de amilasa en relación con otras especies que comparte esta categorización (Bolaños-Núñez et al., 2021). La figura 19, muestra claramente como el medio MRS tiene un mejor aprovechamiento del consumo de azúcares, atribuido principalmente a la consideración que hay sobre la glucosa como la principal fuente de carbono por todos los microorganismos dado a su tamaño, rápida absorción, utilización y conversión de energía celular (Choi et al., 2011). Sin embargo, las BAL han demostrado tener capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono basándose en la actividad de enzimas específicas en la degradación de diferentes fuentes de carbono (Choi et al., 2011; Jawan et al., 2020). Además, se ha reportado que la cepa de *Streptococcus infantarius* cuentan con el gen necesario para metabolizar otros carbohidratos que sean distintos al almidón, como por ejemplo la sacarosa, hemicelulosa, celulosa y residuos de almidón (Bolaños-Núñez et al., 2021).

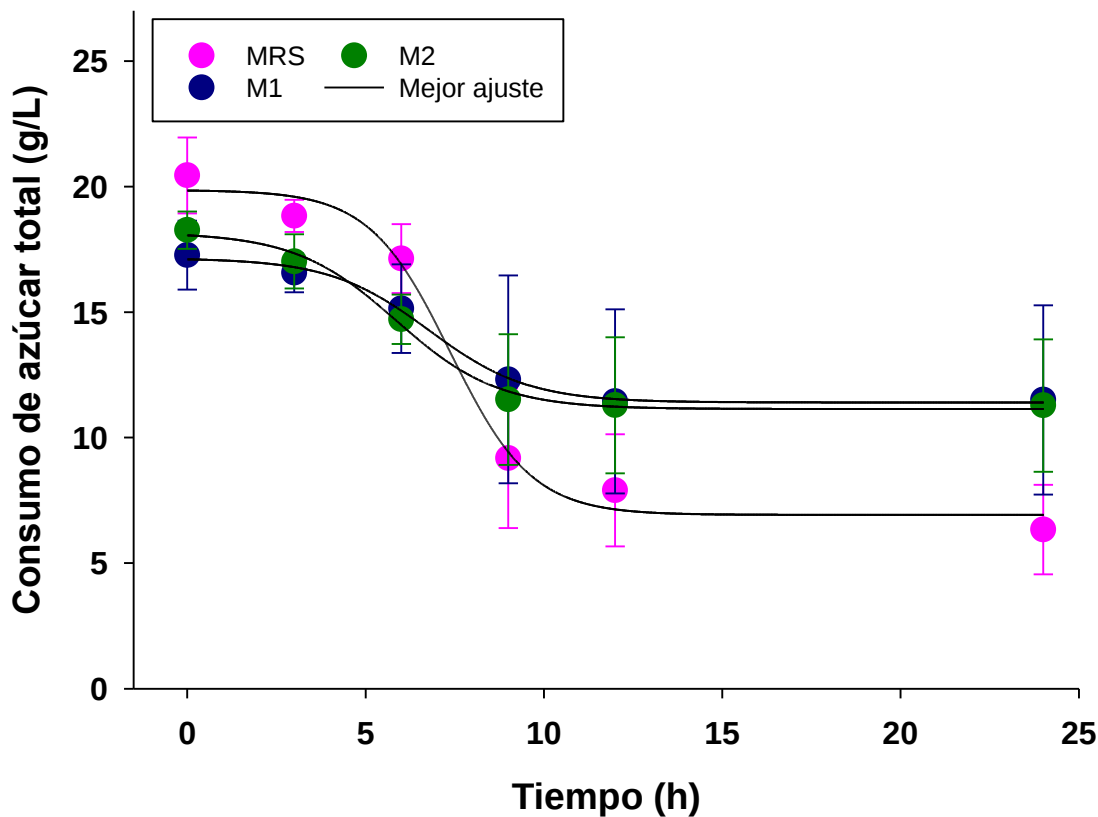


Figura 17 Perfil del consumo de azúcares totales durante la cinética de crecimiento de *Streptococcus infantarius* en condiciones de reposo a 37°C en medio de cultivo MRS (medio estándar comercial) y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey).

En este sentido, el medio M1 cuenta con lactosa que es un disacárido [β -d-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-d-glucosa] que por hidrólisis produce d-glucosa y d-monómeros de galactosa (Rocha & Guerra, 2020) y sacarosa compuesta por glucosa unida a fructosa mediante un enlace glicosídico y el M2 que contiene además de lactosa, los fructooligosacáridos, que al ser de origen de jarabe de maguey posiblemente sean en mayor parte inulina, entonces estas moléculas de carbohidratos estarían compuestas por monómeros de fructosa con muy pocos residuos de glucosa que casi siempre están al final de la cadena; también se les conoce como fructanos. Se hace mención de que sean en su mayoría inulina, dado a que en este tipo de fructosas se presenta una unión predominante o exclusiva a través del enlace β -(2-1)-fructosil-fructosa y una glucosa terminal con enlace α -(1-2)-(D-glucopiranosil) recibiendo el nombre genérico de inulina. Donde las unidades pueden variar entre pocas o hasta 70 unidades (Alcocer et al., 2014; Choi et al., 2011). Además, dicha información arrojada en

este análisis proporciona herramientas para realizar el cálculo del rendimiento y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales), para visualizar con mayor exactitud la incidencia de estos azúcares con *Streptococcus infantarius*. En un trabajo reportado con *S. bovis* 25124 informan sobre el consumo de esta cepa en un medio de MRS-almidón a 30°C, a las 10.5 h de fermentación había un consumo de 26.6% de los azúcares totales, valores que se mantuvieron constantes a las 26 h de fermentación (Díaz-Ruiz et al., 2003). Con lo anterior, podemos apreciar que la cepa trabajada en este proyecto con los medios alternativos propuestos, tuvieron un mejor aprovechamiento de carbohidratos presentes, respecto a lo reportado para *S. bovis* 25124, 33.4 y 38.2 % para medio M1 y M2, respectivamente.

7.3.3.- Rendimiento, velocidad de crecimiento máxima y velocidad de consumo de sustrato (azúcares totales)

En la Tabla 7 se hace una síntesis de los resultados con base en los estudios anteriormente desarrollados de manera experimental. Para los datos de concentración de biomasa y del consumo de azúcares totales fueron ajustados a modelos a convenir según reportes encontrados en la literatura quedando el modelo Sigmoidal de Gompertz de 4 parámetros (3) y Sigmoidal de 4 parámetros (5), respectivamente para cada caso, mediante el programa SigmaPlot v.14, obteniéndose coeficientes de acuerdo al medio de cultivo empleado, para la concentración de biomasa en MRS la $R^2=0.9998$, M1 la $R^2=0.9998$, M2 la $R^2=0.9996$ y para el consumo de azúcares totales en MRS la $R^2=0.9948$, M1 la $R^2=0.9984$, M2 la $R^2=0.9967$. Posteriormente, dichos coeficientes fueron asociados con la Ec. (4) y E. (6) para concentración de biomasa y consumo de azúcares totales, respectivamente, mediante el programa MathCAD Prime 7.0.0.0, se determinaron las evoluciones de la velocidad específica de crecimiento ($\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$; h^{-1}) y de la velocidad específica de consumo de azúcares totales ($qs = -(\frac{d}{dt} c(t)) \cdot \frac{1}{x(t)}; \frac{g \text{ azúcar total}}{g \text{ biomasa}} \cdot h^{-1}$). Para el rendimiento final se empleó la Ec. (7).

Tabla 7 Parámetros obtenidos en cinéticas de fermentación de *Streptococcus infantarius* con los distintos medios de cultivo evaluados: MRS como medio control y medios alternativos como M1 (suero de leche y melaza de caña de azúcar) y M2 (suero de leche y jarabe de maguey)

BAL	MEDIO DE CULTIVO	Velocidad específica de:		Rendimiento final
		Crecimiento máximo ($\mu_{\text{máx}}$)	Consumo máximo de azúcares totales (qs)	
		h^{-1}	$\frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$	$\frac{\text{g biomasa}}{\text{g azúcar total}}$
<i>Streptococcus infantarius</i>	MRS	1.04	2.85	0.06
	M1	0.64	0.67	0.21
	M2	1.29	2.45	0.20

Como ya se presentó anteriormente, las fermentaciones exhibieron cinéticas de crecimiento bacteriano y consumo de azúcares con diferencias interesantes respecto al medio control MRS. *Streptococcus infantarius* presentó en medio de cultivo MRS una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.04h^{-1} , qs de $2.85 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento final de $0.06 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$. De primera instancia, podemos apreciar una diferencia notoria del MRS con respecto al medio M1, sin embargo, tiene resultados similares con respecto al M2. Para el medio de cultivo M1 se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.64h^{-1} y un rendimiento final de $0.21 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$, mientras que para el M2 los resultados son una $\mu_{\text{máx}}$ de 1.29h^{-1} y un rendimiento final de $0.20 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}}$. La diferencia mayor encontrada entre los medios alternativos fue en el qs donde para M1 fue de $0.67 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y para el M2 $2.45 \frac{\text{g azúcar total}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$. Estos resultados nos indican que la BAL tiene una mejor tasa máxima de crecimiento específica en el medio M2, el MRS tiene un mejor consumo de azúcares totales, pero en los dos medios de cultivo alternativos se obtuvo un rendimiento final similar. Lo anterior sugiere que la BAL presenta mayor dificultad para hidrolizar los azúcares contenidos en el M1 (lactosa del suero de leche y sacarosa de la melaza de caña de azúcar), comparados con el M2 a base de suero de leche y jarabe de maguey (lactosa y fructooligosacáridos), además de la glucosa que puede hallarse en el medio MRS, debido a sus resultados similares en el medio M2, la BAL tiene un mejor aprovechamiento de fuentes de carbono de los medios MRS y M2 (Díaz-Ruiz et al., 2003). Pero, además, se considera que el medio M2 tiene una conversión eficiente de la energía en biomasa, dado su rendimiento. En investigaciones previas a este trabajo y utilizando la misma

cepa, se obtuvieron para medios de cultivo con base de lactosuero reportes de 0.56 h^{-1} (López-Ortega, 2014) y medio de cultivo con base de melaza de 0.28 h^{-1} (Sánchez-Reyes, 2014). Cabe mencionar que estos trabajos previos fueron en otras condiciones operación y con uso de biorreactor. Se destaca que el uso de los medios de cultivo propuestos ha mejorado el crecimiento máximo de biomasa en contraste a lo reportado en 2014. Otros autores, han reportado para *S. bovis* $25124 \mu_{\text{máx}}$ de 0.94 h^{-1} , un q_s de $3 \frac{\text{g sustrato}}{\text{g biomasa}} \cdot \text{h}^{-1}$ y un rendimiento de $0.31 \frac{\text{g sustrato}}{\text{g biomasa}}$, pero en un medio a base de MRS-almidón a 30°C , después de 24 h de fermentación. Dichos resultados, coincide con lo que se reporta para BAL y su capacidad para metabolizar diferentes fuentes de carbono que se basan en la actividad de enzimas específicas en la degradación de diferentes fuentes de carbono (Choi et al., 2011; Jawan et al., 2020).

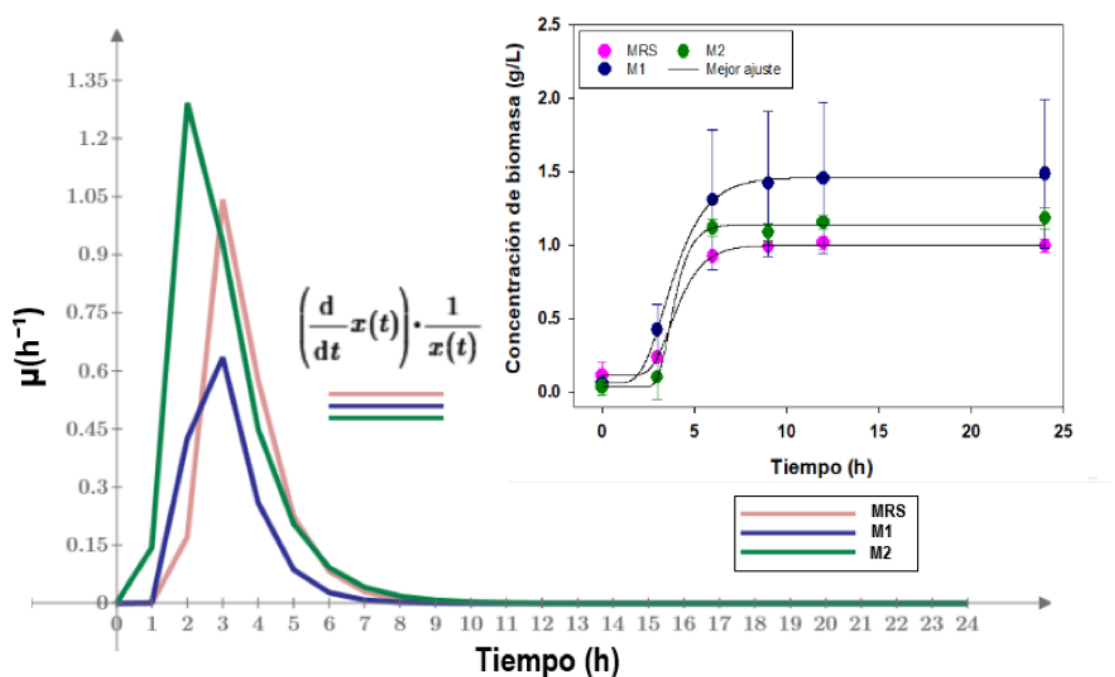


Figura 18 Tasa de crecimiento máxima específica ($\mu_{\text{máx}}$) de *Streptococcus infantarius* en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (4)

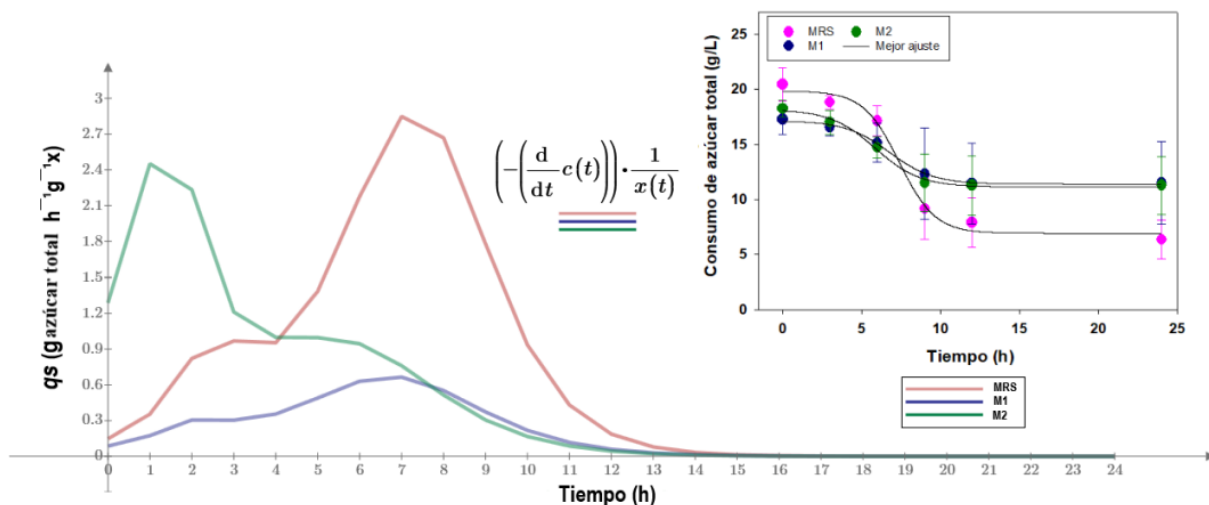
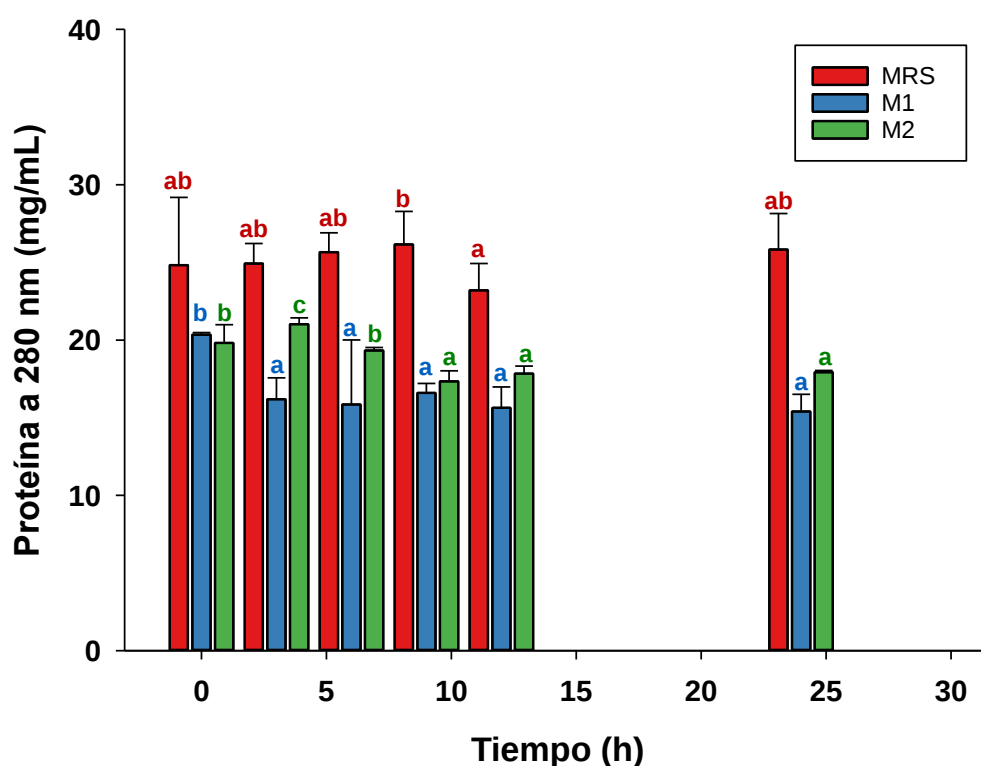


Figura 19 Consumo de azúcar total (qs) de *Streptococcus infantarius* en los medios evaluados MRS, M1 y M2 de acuerdo con la Ec. (6)

7.3.4.- Determinación de proteína soluble en NanoDrop

Las fuentes de nitrógeno son necesarias para todos los procesos de crecimiento biológico, especialmente en la síntesis de proteínas celulares y la producción de ácidos nucleicos, al igual que para el metabolismo bacteriano. En este sentido, tienen un gran impacto sobre la producción de bacteriocinas (Jawan et al., 2020; Sidooski et al., 2018). La determinación de proteínas en los SLC nos permite conocer de alguna manera la cantidad de proteína que podría relacionarse con una producción de bacteriocinas durante la cinética, dada la naturaleza proteica de estas (Sidooski et al., 2018; Sosa et al., 2021). La Figura 21 muestra las concentraciones encontradas en el SLC en cada momento del muestreo durante la cinética de *Streptococcus infantarius*, para MRS se encontraron las mayores concentraciones de proteína tanto para el valor mayor como para el valor mínimo en comparación a los demás medios de cultivo empleados, con $26.16 \text{ mg/mL} \pm 2.13$ (T9) y $23.21 \text{ mg/mL} \pm 1.72$ (T12), respectivamente, encontrándose diferencia significativa (letra b) en el T9 con mayor concentración de proteína, en comparación con los demás tiempos muestreados. En el M1, el valor mayor obtenido es $20.35 \text{ mg/mL} \pm 0.13$ (T0) y el valor mínimo es de $15.38 \text{ mg/mL} \pm 1.11$ (T24), donde se aprecian diferencia significativa entre los tiempos evaluados, encontrándose que el T9, T12 y T24 no son diferentes entre sí (letra a) y tienen los valores menores de concentración de proteínas en los SLC; sin embargo, el T3 muestra diferencia significativa (letra c) con la mayor cantidad de proteína encontrada en los SLC para el medio M1. Para el M2 el valor máximo de proteína obtenido es $21.03 \text{ mg/mL} \pm 0.40$ (T3) y el valor mínimo es de $17.33 \text{ mg/mL} \pm 0.69$ (T9), donde no se encontraron diferencias significativas (letra a) entre los tiempos evaluados. Cabe señalar que pese a encontrarse diferencias

significativas en los resultados, el que no se presenten descensos drásticos respecto a la concentración de proteína en los SLC para los distintos medios evaluados MRS, M1 y M2, posiblemente se deba a la cantidad de aminoácidos y péptidos encontrados en estos medios de cultivo, necesarios para el crecimiento celular que es relacionado con la producción de bacteriocinas (Sidooski et al., 2018). Es importante mencionar, que este análisis es utilizado principalmente como un análisis previo para conocer la concentración y pureza de ARN/ADN (Ahmed et al., 2021; Grande Burgos et al., 2009), sin embargo, para este proyecto nos permitió determinar el contenido de proteínas totales en los SLC a una longitud de onda de 280 nm, tal como algunos otros trabajos han reportado su utilización, aunque en otro tipo de muestras como extractos de *Aloe vera* (Cabello-Ruiz, 2016).



a,b,c Letras minúsculas diferentes indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto del tiempo de fermentación transcurrido en cada muestra sobre la concentración de proteína (mg/mL).

Figura 20 Proteína obtenida en lecturas a 280 nm en NanoDrop en los sobrenadantes libres de células concentrados en SpeedVac de los tiempos 0, 3, 6, 9, 12 y 24 h de la cinética con *Streptococcus infantarius*.

7.3.5.- Concentración mínima inhibitoria (CMI)

En la Tabla 8 se muestran los resultados para la CMI de la BLIS para *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. Donde los resultados son expresados de manera cuantitativa, así podremos notar que se obtuvo la CMI, tanto en controles utilizados y SLC, además de la diferencia significativa encontrada al someter los resultados obtenidos en la CMI al programa SPSS.v.25.00, donde se sometieron a la prueba HSD Tukey tanto los controles con SLC, así como las concentraciones utilizadas en las CMI (Ver “Anexo 5”). En este sentido, para *L. monocytogenes* en el medio MRS su CMI se encontró para el control en nisina a 20 mg/mL y en los SLC en los T3, T6, T9, T12 y T24 a los 5 mg/mL, no habiendo diferencia significativa entre controles y SLC. Para M1 su CMI se encontró en nisina a 20 mg/mL (ab), destacándose que, aunque no hay diferencia significativa, respecto a los SLC, en este se encuentra su CMI a los tiempos T3, T6, T9, T12 y T24 a 5 mg/mL (letra a), estos últimos sin diferencia significativa respecto al control negativo. Ahora bien, para el M2 se obtuvo la CMI en los controles con nisina a 20 mg/mL, no teniendo diferencia significativa (letra a), respecto a todos los tiempos evaluados en la CMI a una concentración de 5 mg/mL. Para el caso de *Staphylococcus aureus* en el medio MRS su CMI es de 80 mg/mL con nisina en los controles, teniendo diferencia significativa con el mejor tiempo evaluado de los SLC T0 a 20 mg/mL (letra b). En el M1 en los controles el M1 a 20 mg/mL tiene la CMI (letra a), con diferencia significativa respecto a los SLC de los T6 (letra c) a 40 mg/mL. Y para el M2 se obtuvo para los controles la CMI en el M2 a 40 mg/mL (letra ab) sin diferencia significativa respecto al control negativo, pero en el caso de los SLC la CMI se posiciona en los T12 y T24 (letra b) a 40 mg/mL. Los casos donde el M1 y M2, tienen la “mejor” CMI puede deberse a que los SLC y controles de los medios de cultivo empleados fueron concentrados a una relación 5:1, con ellos el M1 y M2 tienen una saturación de azúcares, por lo cual no hubo crecimiento del indicador patógeno, derivando en que la concentración excesiva del sustrato natural conduce a altas concentraciones de carbohidratos, lo que aumentará la presión osmótica que cambia o destruye las capacidades de las cepas para transportar y metabolizar cada componente (Wang et al., 2021). Cabe destacar, que el hecho de que en el análisis de la CMI no se hayan encontrado diferencias significativas con respecto a la nisina es valioso, dado que la nisina se utilizó como un control por ser un péptido originado principalmente por la BAL *Lactococcus lactis* subsp. *.lactis* producido en la actualidad a escala industrial, que tiene aplicaciones en el ámbito alimenticio, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los diferentes factores que afectan la producción y purificación de péptidos antimicrobianos es elevada respecto a los costos (Khelissa et al., 2020). En la mayor parte de los trabajos reportados, se utiliza como prueba antimicrobiana el método de dilución crítica (López-Ortega, 2014) donde se visualizan zonas de inhibición en una caja Petri, en su mayoría expresadas en UA/mL, que no es más que expresar el recíproco de la dilución más alta que produce una zona de inhibición definida en una placa de agar inoculada con un microorganismo indicador (Cardoso, 2012). En este proyecto se empleó como prueba antimicrobiana la concentración mínima inhibitoria (CMI), donde el principal objetivo es la

determinación de la concentración más baja del agente antimicrobiano analizado (Wiegand et al., 2008). En este sentido, el punto de comparación y referencia sería el tiempo donde se ha reportado actividad antimicrobiana, en las investigaciones donde no se haya aplicado la misma metodología desarrollada en este proyecto. Para la *Listeria monocytogenes* existe para esta especie pocos reportes pero en el grupo de trabajo se destacan investigaciones previas al respecto (López-Ortega, 2014), al igual que aplicaciones en la adición a formulación de películas (Jiménez-Villeda et al., 2019), en esta última también hubo efectividad contra *Staphylococcus aureus*. A mencionar esta última, hay otro reporte que engloba a *S. infantarius*, *S. gallotycus* y *S. lutetiensis* con actividad contra *S. aureus*. Un trabajo de investigación reporta actividad contra cepas de *S. pneumoniae* cultivada en medio MRS, a 30 °C por 16 h , donde su actividad antimicrobiana más fuerte se mostró a las 12 h (Campanero et al., 2020).

Tabla 8 Concentración mínima inhibitoria encontrada en los controles utilizados y en los sobrenadantes libres de células de *Streptococcus infantarius* en los medios MRS, M1 y M2 para los microorganismos patógenos *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Patógeno	Medio de cultivo	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Control	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Sobrenadantes libres de células (SLC)
<i>Listeria monocytogenes</i>	MRS		Nisina ^a	5	T3a, T6a, T9 ^a , T12 ^a , T24 ^a
	M1	20	Nisina ^{ab}	5	T3 ^a , T6 ^a , T9 ^a , T12 ^a , T24 ^a
	M2		Nisina ^a	5	T0 ^a , T3 ^a , T6 ^a , T9 ^a , T12 ^a , T24 ^a
<i>Staphylococcus aureus</i>	MRS	80	Nisina ^a	20	T0 ^b
	M1	20	M1 ^a	40	T6 ^c
	M2	40	M2 ^a	40	T12 ^b , T24 ^b

^{a,b,c} Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

7.4.- Conclusiones

Con relación al desarrollo, consumo de azúcares totales y actividad antimicrobiana de la bacteria ácido-láctica, *Streptococcus infantarius* aislada de *Pozol*, una bebida tradicional del Sureste mexicano, en el progreso de esta investigación se concluye lo siguiente:

- Las fermentaciones a nivel laboratorio realizadas en condiciones de reposo a 37 °C, indican que el medio alternativo propuesto en este estudio a base de suero de leche con melaza y/o jarabe de maguey ha permitido el crecimiento de la BAL *Streptococcus infantarius* con la producción de sustancias antimicrobianas, principalmente con actividad anti-listerial, lo que significa que estos cultivos pueden ser una posibilidad de sustitución de medios de cultivo estándar como el caldo MRS, que tienen costos elevados que inciden en incrementos en los procesos de producción de péptidos antimicrobianos.
- El consumo de carbohidratos fue muy parecido entre los tres medios utilizados.
- Tanto el medio M1 y M2 producen BLIS, la cual tiene diferente CMI contra las bacterias indicadoras.

7.5.- Referencias bibliográficas

- Abo-Amer, A. E. (2010). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus acidophilus* AA11, a strain isolated from Egyptian cheese. *Annals of Microbiology*, 61(3), 445-452. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0157-6>
- Alcocer, S. A. H., Corona, C., & Zapata, J. (2014). Aplicación de subproductos del agave para la producción de inulinasas microbianas. *Revista bio ciencias*, 3(1), 4-16. <http://revistabiociencias.uan.mx/index.php/BIOCIENCIAS/article/view/109/84>
- Arzola-Sotelo, E. A. (2013). *Aplicación de la teoría de modelos múltiples en la evaluación del crecimiento individual del chano (Micropogonias megalops, Gilbert 1890) en el norte del Golfo de California*. http://dspace.cibnor.mx:8080/bitstream/123456789/368/1/arzola_e.pdf
- Bolaños-Núñez, S., Santiago-Urbina, J. A., Guyot, J., Díaz-Ruiz, G., & Wachter, C. (2021). Microbial interactions between amylolytic and Non-Amylolytic lactic acid bacteria strains isolated during the fermentation of pozol. *Foods*, 10(11), 2607. <https://doi.org/10.3390/foods10112607>
- Bouvet, A., Grimont, F., Collins, M. D., Benaoudia, F., Devine, C., Regnault, B., & Grimont, P. A. (1997). *Streptococcus infantarius* sp. nov. Related to *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. In *Streptococci and the Host* (pp. 393–395). Springer US.
- Cabello-Ruiz, E. D. (2016). *Aislamiento, purificación e identificación de péptidos, proteínas y glicoproteínas de aloe vera con actividad antimicrobiana*. <http://eprints.uanl.mx/13689/>
- Campanero, C., Muñoz-Atienza, E., Diep, D. B., Feito, J., Arbulu, S., Del Campo, R., Nes, I. F., Hernández, P. E., Herranz, C., & Cintas, L. M. (2020). Biochemical, genetic and transcriptional characterization of multibacteriocin production by the anti-pneumococcal dairy strain *Streptococcus infantarius* LP90. *PLOS ONE*, 15(3), e0229417. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229417>
- Castro, G., Valbuena, E., Sánchez, E., Briñez, W. J., Vera, H., & Leal, M. (2008). Comparación de modelos sigmoidales aplicados al crecimiento de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Revista Científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia*, 18(5), 582-588. <https://www.redalyc.org/pdf/959/95918509.pdf>
- Choi, H. Y., Kim, J. S., & Kim, W. J. (2011). Optimization of conditions for the maximum bacteriocin production of *enterococcus faecium* DB1 using response surface methodology. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 31(2), 176-182. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2011.31.2.176>

-
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J., Ruíz-Terán, 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(8), 4367-4374. <https://doi.org/10.1128/aem.69.8.4367-4374.2003>
- Dos Santos, K. M. O., De Matos, C. R., Salles, H. O., De Melo Franco, B. D. G., Arellano, K., Holzapfel, W. H., & Todorov, S. D. (2020). Exploring Beneficial/Virulence properties of two Dairy-Related strains of *Streptococcus Infantarius* Subsp. *Infantarius*. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 12(4), 1524-1541. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09637-8>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Escalante, M. (2023). *Bioprospección de novedosos exopolisacáridos y plásticos haloarqueales Acumulados por haloferax mucosum: producción, caracterización química y macromolecular*. [Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo].
- García-Curiel, L. (2021). *Purificación y caracterización de bacteriocinas producidas por Streptococcus infantarius* [Tesis de doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- García-Curiel, L., López-Cuellar, M., Rodríguez-Hernández, A., & Chavarría-Hernández, N. (2021). Toward understanding the signals of bacteriocin production by streptococcus SPP. and their importance in current applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 37(1). <https://doi.org/10.1007/s11274-020-02973-5>
- Jawan, R., Abbasiliasi, S., Tan, J. S., Mustafa, S., Halim, M., & Ariff, A. (2020). Influence of culture conditions and medium compositions on the production of Bacteriocin-Like inhibitory substances by *Lactococcus lactis* GH1. *Microorganisms*, 8(10), 1454. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101454>
- Jiménez-Villeda, P., Rodríguez-Hernández, A. I., López-Cuellar, M., Franco-Fernández, M., & Chavarría-Hernández, N. (2019). Elaboration and characterization of pectin-gellan films added with concentrated supernatant of *Streptococcus infantarius* fermentations, and EDTA: effects on the growth of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in a Mexican cheese medium, and physical-mechanical properties. *Food Science and Technology*, 39(2), 436-443. <https://doi.org/10.1590/fst.32717>
- Khelissa, S., Chihib, N., & Gharsallaoui, A. (2020). Conditions of Nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and its main uses as a food preservative. *Archives of Microbiology*, 203(2), 465-480. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02054-z>
-

-
- López-Ortega, M. A. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria de alimentos, mediante el cultivo de bacterias ácido lácticas usando medios de cultivo alternativos*. [Tesis maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Mendoza-Mendoza, B. (2012). *Caracterización de películas a base de caseinato de sodio, con la inclusión de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido-lácticas aisladas de Pozol* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Moreira, N. L., Santos, L. F. D., Soccol, C. R., & Suguimoto, H. H. (2015). Dynamics of ethanol production from deproteinized whey by *Kluyveromyces Marxianus*: An analysis about buffering capacity, thermal and nitrogen tolerance. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(3), 454-461. <https://doi.org/10.1590/s1516-8913201500372>
- Orozco-Álvarez, C., Molina-Carbajal, E., Megchun-Díaz, J., Osorio-Mirón, A., & Robles-Martínez, F. (2019). DESARROLLO DE UN MODELO MATEMÁTICO PARA EL BIOSECADO DE RESIDUOS SÓLIDOS ORGÁNICOS EN PILAS. *Revista Internacional De Contaminacion Ambiental*, 35(esp02), 79-90. <https://doi.org/10.20937/rica.2019.35.esp02.08>
- Özkan, E. R., Öztürk, H. İ., Demirci, T., & Akın, N. (2021). Detection of biofilm formation, virulence factor genes, antibiotic-resistance, adherence properties, and some beneficial properties of cheese Origin *S. infantarius*, *S. gallolyticus*, and *S. lutetiensis* strains belonging to the *S. bovis*/*S. equinus* complex. *LWT*, 150, 112077. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112077>
- Pérez-Arauz, Á., Rodríguez-Hernández, A., López-Cuellar, M., Martínez-Juárez, V., & Chavarría-Hernández, N. (2020). Films based on pectin, gellan, EDTA, and bacteriocin-like compounds produced by *Streptococcus infantarius* for the bacterial control in fish packaging. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(1). <https://doi.org/10.1111/jfpp.15006>
- Ramírez-Barrera, G. (2011). *Desarrollo y validación de modelos predictivos dinámicos del crecimiento de Staphylococcus aureus en productos cárnicos previo al proceso de cocción*. [Tesis de maestría]. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.
- Sánchez-Reyes, W. Y. (2014). *Producción de sustancias con actividad antimicrobiana de uso potencial en la industria alimentaria, mediante el cultivo de la bacteria ácido-láctica, Streptococcus infantarius, en medios complejos que contienen melazas* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S. L., De Souza, C. K., & De Carvalho, L. F. (2018). Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic
-

-
- acid bacteria – a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(17), 2839-2849. <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1474852>
- Sosa, F. M., Parada, R. B., Marguet, E. R., & Vallejo, M. (2021). Utilization of Agro-Industrial byproducts for bacteriocin production using enterococcus spp. strains isolated from Patagonian marine invertebrates. *Current Microbiology*, 79(1). <https://doi.org/10.1007/s00284-021-02712-5>
- Trejo-González, L. (2021). *Investigación acerca de bacteriocinas producidas por bacterias ácido-lácticas aisladas de quesos artesanales, con potencial biotecnológico*. [Tesis de Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Wang, S., Tian, R., Liu, B., Wang, H., Li, J., Li, C., Li, M., Evivie, S. E., & Li, B. (2021). Effects of carbon concentration, oxygen, and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01257-x>
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

8.- Recomendaciones para futuras investigaciones

- Explorar más condiciones de fermentación para las BAL *Enterococcus faecium* y *Streptococcus infantarius*, como, por ejemplo, condiciones de agitación, distinto % de inóculo y relación C/N en los medios de cultivo alternativo como se describe en la literatura citada en este documento.
- Purificar los sobrenadantes libres de células obtenidos en las condiciones ya exploradas, con métodos como adsorción/desorción, con el propósito de evaluar más a detalle la actividad antimicrobiana producida en un mayor número de cepas patógenas de interés alimentario, asimismo de interés de salud pública.
- Caracterizar los efectos de la temperatura, pH, enzimas y tiempo de almacenamiento sobre la actividad antimicrobiana producida de los sobrenadantes libres de células.
- Evaluar la capacidad probiótica de las cepas *E.faecium* y *S.infantarius*.

9.- Anexos

Anexo I: Medios de cultivo alternativos

a. Reactivos químicos

Los químicos usados fueron:

Reactivo DNS: Hidróxido de sodio (NaOH) (Química Meyer, México) 10 g/L, tartrato de sodio y potasio (Química Meyer, México) 20 g/L, metabisulfito de sodio (Química Meyer, México) 0.5 g/L, fenol 2 g/L y ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich®, India) 10 g/L.

Mezcla digestora:

Ácido bórico (H_3BO_3) (Merck, Alemania), ácido clorhídrico (HCl)(J.T.Baker®,México), ácido sulfúrico concentrado(H_2SO_4)(J.T.Baker®,México), lactosa (Fluka TM,México) , glucosa (Técnica Química, México) , reactivo Bradford(Quick StartTM Bradford, EE.UU.), proteína de Sero-albúmina bovina (SAB) (MPTM, EE.UU.)

b. Ingredientes para formular medios de cultivo

Caldo soya tripticaseína (BD Bioxon® México), extracto de carne (BD Bioxon® México), extracto de levadura (BD Bioxon® México), melaza (Ingenio azucarero: San José de Abajo, Veracruz, México. Zafra 2021-2022), jarabe de maguey (Botánica tradicional, México), pharmamedia (Traders Protein, EE.UU.) 1g/L, proflo (Traders Protein, EE.UU.), suero de leche (Food Technologies Trading S.A. de C.V,México).

Anexo II: Determinaciones analíticas de materias primas para fermentación

- A II.1.- Determinación de azúcares reductores (Miller, 1959)

La concentración de azúcares reductores en las materias primas que componen el medio de cultivo para la fermentación de las BAL y la producción de bacteriocinas, se determinó por un método colorimétrico DNS (Figura A1), que permite conocer la concentración de monosacáridos reductores libres (Miller, 1959).

Sensibilidad: 1 g/L de azúcar reductor.

Se generaron dos curvas de calibración, una con solución madre de lactosa (SML) y una de glucosa (SMG) a concentración cada una de 1 mg/mL. Las concentraciones tratadas en ambas curvas fueron desde 0.1 mg/mL a 1.0 mg/mL.

Se colocaron 100 μ L de muestra en tubo Eppendorf y se agregaron 100 μ L de reactivo DNS. La mezcla se agitó en vórtex y los tubos correctamente sellados se colocaron en baño en ebullición durante 10 min. A continuación, se enfriaron los tubos en hielo. Se agregaron 800 μ L de agua destilada a cada tubo y agitó en vórtex. Se vació 700 μ L a celdas de vidrio. Finalmente se midió la absorbancia a 545 nm en un espectrofotómetro Génesis 10 UV-VIS®.



Figura A1 Determinación de azúcares reductores en ingredientes para formular medios de cultivo.

- A II.2.- Determinación de azúcares totales (Dubois et al., 1956)

Este método fue desarrollado por Dubois et al. (1956). La propuesta se basó en el hecho que los carbohidratos son particularmente sensibles a ácidos fuertes y a las altas temperaturas. En estas condiciones, tiene lugar una serie compleja de reacciones que comienzan con una deshidratación simple, calentamiento continuo y catálisis ácida para producir varios derivados de furano, que se condensan consigo mismos y con otros subproductos. La condensación más común ocurre con los fenoles. Teniendo en cuenta que todos los azúcares se pueden identificar como oligosacáridos y polisacáridos, pero estos producen

monosacáridos tras la hidrólisis ácida. La forma en que procede la reacción no es estequiométrica y depende de la estructura del azúcar.

Este método es visiblemente cualitativo, ya que la cantidad de muestra reacciona primero con fenol y posteriormente con ácido sulfúrico presentando un cambio drástico de color, donde la intensidad del color naranja de este es proporcional a la cantidad total de carbohidratos presentes (Dubois et al., 1956).

Sensibilidad hasta 0.1 g/L de azúcar total.

Soluciones:

- a) Solución madre de glucosa 0.1 g/L (p/v)
- b) Solución de fenol al 5% (p/v)

Metodología:

Cada tubo de vidrio se rotuló y etiqueto de acuerdo con la muestra (Figura A2). Las muestras fueron diluidas de acuerdo con la sensibilidad del método. Se inició agregando a cada tubo 0.250 mL de muestra. (Nota: Se usaron para el blanco 0.250 mL de agua en lugar de muestra.). La solución de fenol se adicionó a cada tubo en 0.250 mL El ácido sulfúrico concentrado lentamente se agregó a cada tubo en 1.250 mL Se taparon los tubos y cada uno se cubrió en la tapa con Parafilm. Se homogenizó con vórtex 15 s. En agua a 100°C durante 15 min fueron colocados. Posteriormente los tubos del baño de agua a 100°C fueron enfriados en un baño de agua fría. Se leyó la absorbancia exactamente 5 min después de enfriar (490 nm) en un espectrofotómetro Génesis 10 UV-VIS®.

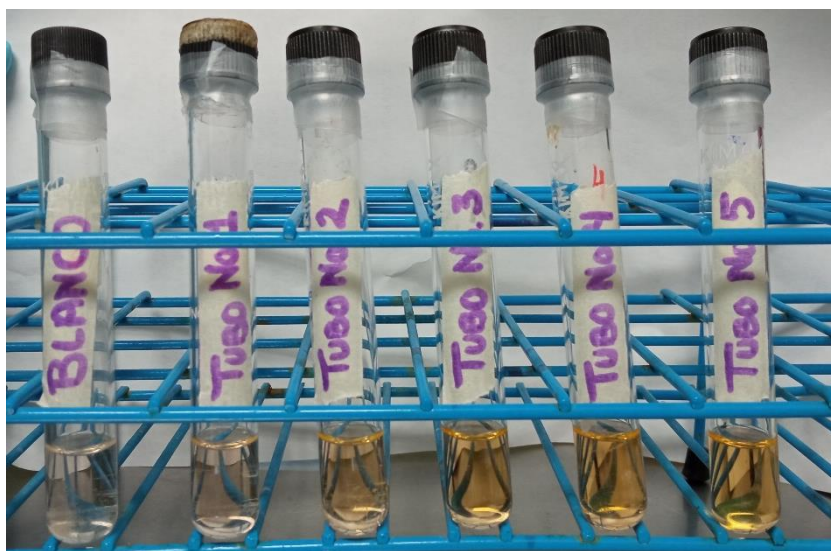


Figura A2 Determinación de azúcares totales en ingredientes para formulación de medios de cultivo

- A II.3.- Determinación de proteínas soluble (Bradford, 1976)

La cuantificación de proteínas por el método de Bradford consiste en la medición de la unión del colorante, Coomassie Blue G-250, a las proteínas por comparación con la unión de cantidades variables de una proteína estándar (albúmina de suero bovino).

Metodología:

Se preparó una curva estándar de proteína de Sero-albúmina bovina SAB hasta 1 mg/mL.

En un tubo cónico de 15 mL se agregó 20 μ L de muestra proteica, donde después se agregó 1 mL de reactivo de Bradford y se dejó reposar 2-5 min, terminado este tiempo se mezcló en vórtex (Figura A3). Posterior a ello, 700 μ L de mezcla de reacción se midieron con micropipeta y se adicionaron a una celda de vidrio. La absorbancia se leyó a 595 nm en un espectrofotómetro Génesis 10 UV-VIS®. El tubo de control negativo (con agua destilada en lugar de muestra proteica) fue colocado primero, dado que se leyó de menor concentración a mayor concentración.

NOTA: el reactivo de Bradford es de color morado-marrón y cuando la concentración de proteína incrementa vira hacia azul.

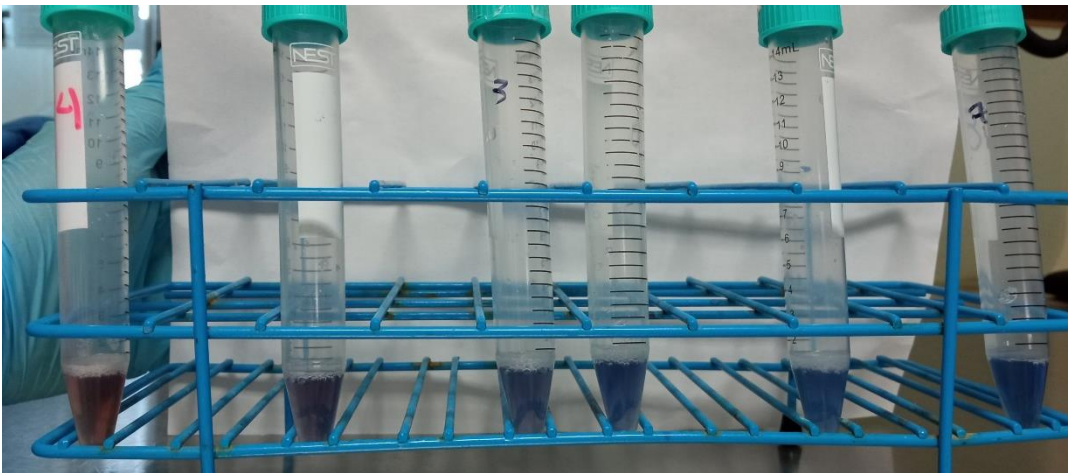


Figura A3 Determinación de proteína soluble en ingredientes para formulación de medios de cultivo.

- A II.4.- Determinación de proteínas. Método Kjeldahl

El método Kjeldahl mide el contenido de nitrógeno de una muestra. Luego, el contenido de proteína se puede calcular dada la proporción de proteína a nitrógeno del alimento en particular que se está probando. El método Kjeldahl se puede dividir básicamente en tres partes: (1) digestión, (2) destilación y (3) titulación. En el paso de digestión, el nitrógeno orgánico se convierte en amonio a aproximadamente 370 °C en presencia de un catalizador. En el paso de destilación, la muestra digerida se alcaliniza con NaOH y el nitrógeno se destila como NH₃. Este NH₃ queda "atrapado" en la solución de ácido bórico. La cantidad de nitrógeno amoniacal en esta solución se cuantifica por titulación con soluciones estándar de

HCl. Se pasa un blanco de reactivo por el análisis y se resta la cantidad de titulante de HCl requerida para ese blanco de cada mediciones (Nielsen, 2017).

Metodología:

En un tubo de digestión Kjeldahl se agregaron 0.07 g de muestra, 1 g de mezcla digestora (CuSO_4 y K_2SO_4) y 10 mL de H_2SO_4 concentrado.

El tubo se colocó en un digestor (BUCH K-425/K/436) y se digirió la muestra durante 6 h aproximadamente. Una vez que las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se agregaron 10 mL de agua destilada, NaOH al 40% (p/p) en exceso y se destilaron durante 5 min (Figura A4).

El destilado fue recuperado en 30 mL de H_3BO_3 al 4% p/p, el cual se valoró con HCl 0.1 N, usando rojo de metilo como indicador. El porcentaje total de nitrógeno se calculó empleando la Ecuación A.1 y un factor para convertir nitrógeno total a contenido de proteína. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Para conocer el vapor de proteína cruda a partir del contenido de nitrógeno se utiliza un factor, que varía según el origen de la proteína, por ejemplo:

f= 6.25 (proteína animal)

f= 6.38 (proteína de leche o derivados)

f= 5.7 (algunos vegetales)

$$\%N = \left(\frac{(V-V_0)(NHCl)(meq)}{Mm} \right) 100 \quad \text{Ecuación A.1}$$

Donde:

N: nitrógeno total (g nitrógeno/ g muestra)

V: volumen de HCl gastado en la titulación de la muestra (mL)

V₀: Volumen de HCl gastado en la titulación del blanco (mL)

N HCl: normalidad de HCl (miliequivalentes /mL)

Meq: peso equivalente del nitrógeno (g/ miliequivalente)

Mm: masa de la muestra (g)



Figura A4 Determinación de N en ingredientes para formulación de medios

A II.5.- Determinación de cenizas

Cenizas se refiere al residuo inorgánico que queda después de ignición u oxidación completa de la materia orgánica en un alimento (Figura A5). El contenido de cenizas representa el contenido mineral total en alimentos. La determinación del contenido de cenizas es importante por varias razones. Es una parte del análisis próximo para la evaluación nutricional (Ismail, 2017).

Metodología (Horwitz Willian & Latimer, 2012):

Los crisoles se pusieron a peso constante en el horno a 100°C por dos días. Al terminar el tiempo indicado se colocaron en el desecador para que se enfríen y se pesan. Se pesaron 0.5 g de muestra en el crisol a peso constante, se pre-calcinó a fuego directo. Fue ingresado cada crisol en la mufla y se programó a 550°C para que por espacio de 4 horas se calcinaron, al final se dejó que bajara la temperatura a 100°C. Se transfirió cada crisol a un desecador y esperó que se enfríe completamente para pesar.

Cálculo:

$$\%C = \frac{B-A}{M} 100$$

Ecuación A.2

Donde:

% C: Porcentaje de cenizas

A: Peso del crisol vacío (g)

B: Peso del crisol con cenizas (g)

M: Peso de la muestra (g)

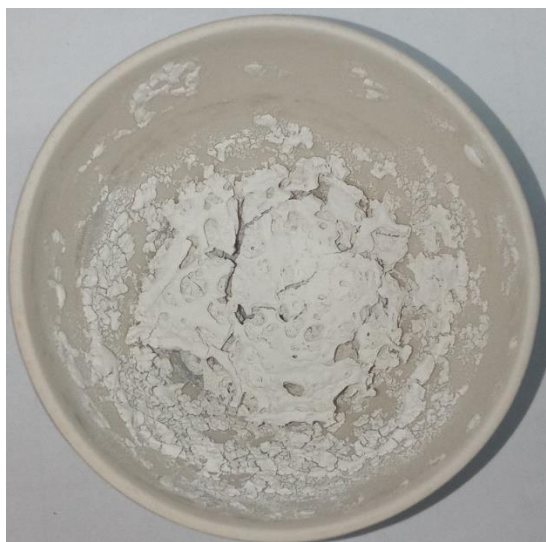


Figura A5 Determinación de cenizas en ingredientes para formulación de medios.

Anexo III: Curvas de calibración para determinaciones analíticas de materias primas y para fermentación

- A III.1.- DNS: azúcares reductores

Glucosa:

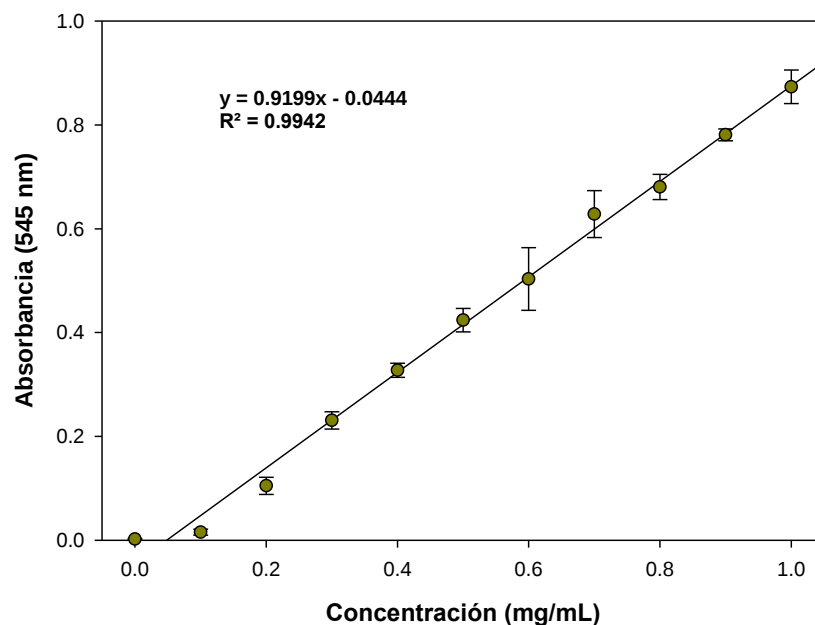


Figura A6 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores (glucosa).

Lactosa:

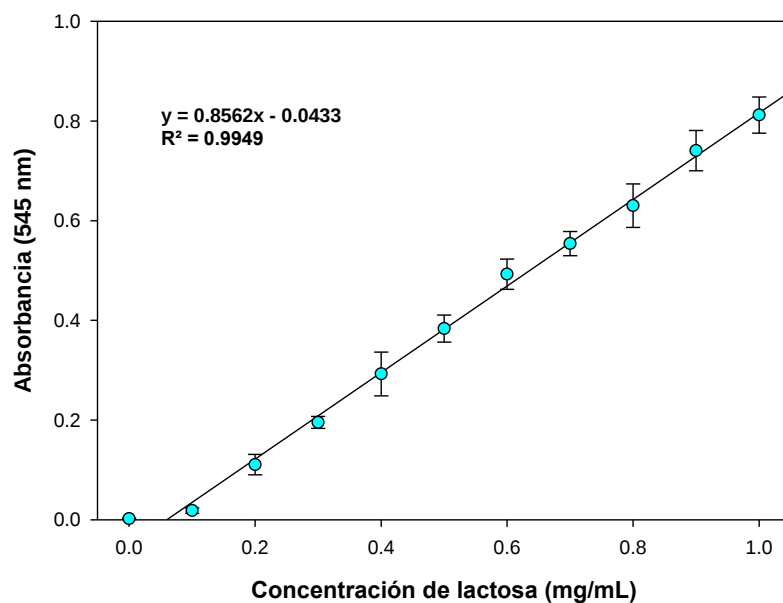


Figura A7 Curva de calibración para la determinación de azúcares reductores (lactosa).

- A III.2.- Fenol Sulfúrico: azúcares totales

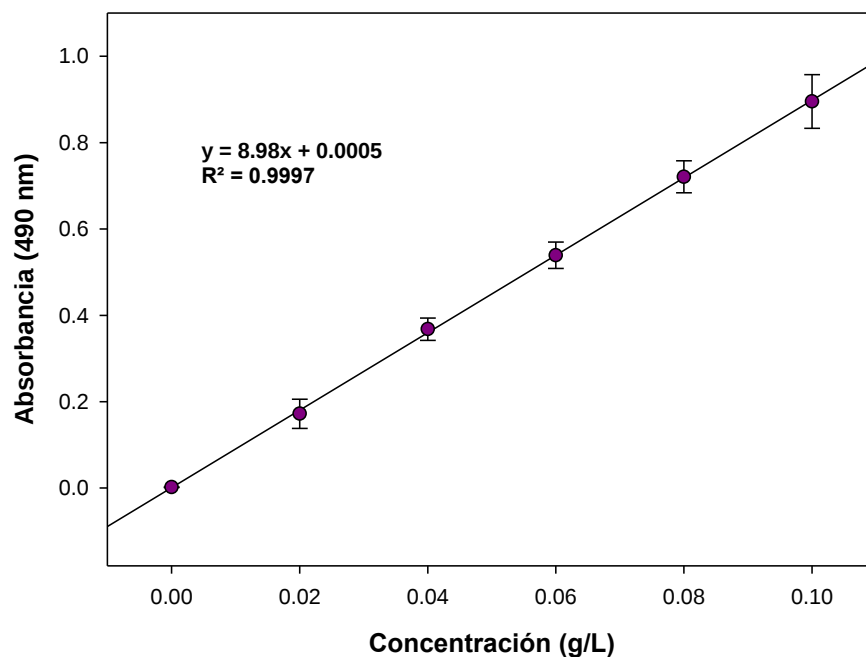


Figura A8 Curva de calibración No. 1 de glucosa para la determinación de azúcares totales.

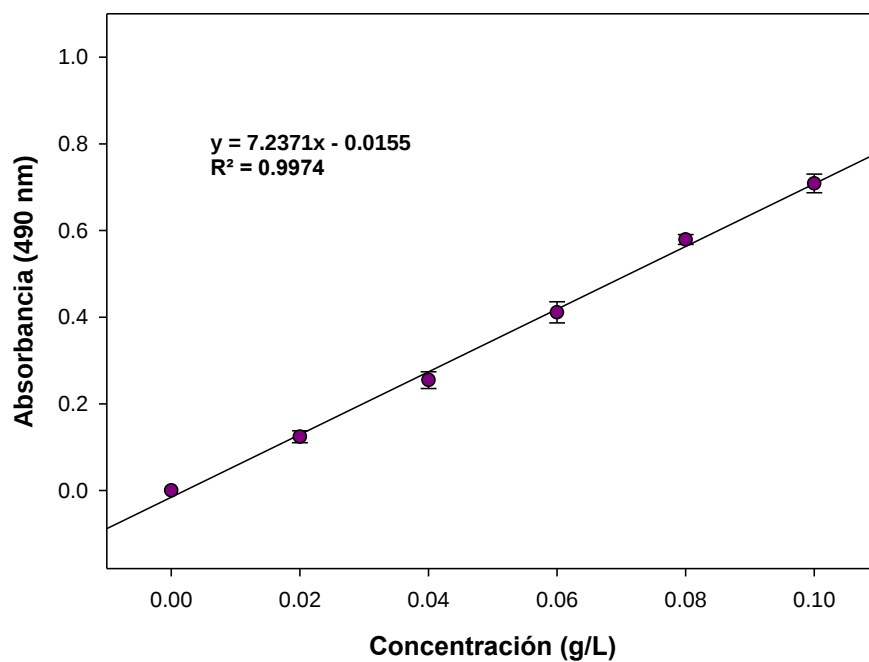


Figura A9 Curva de calibración No. 2 de glucosa para la determinación de azúcares totales.

- A III.3.- Bradford: proteína soluble.

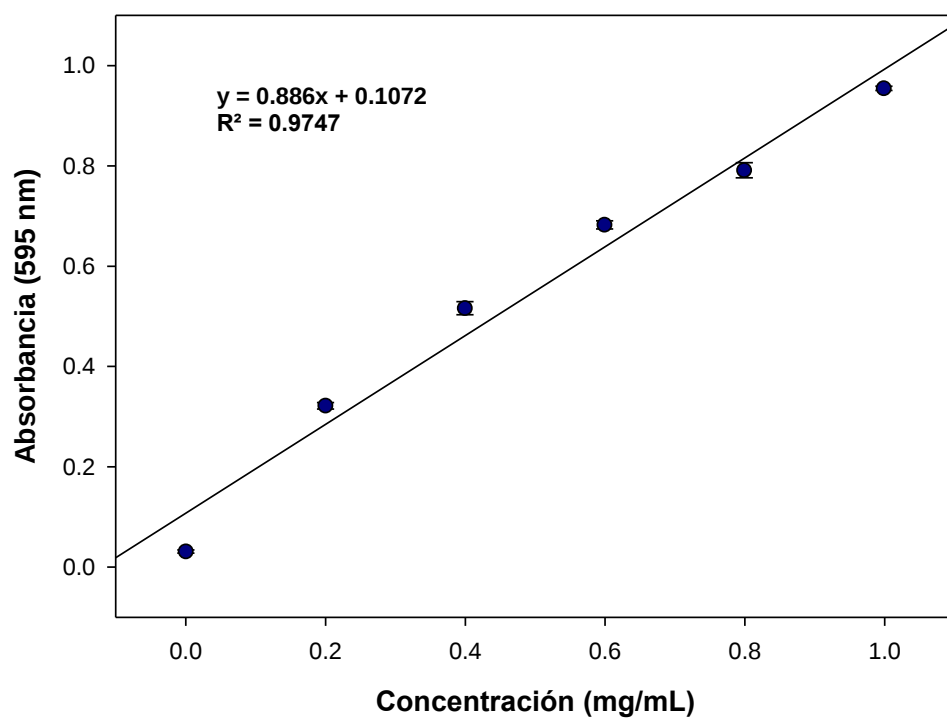


Figura A10 Curva de calibración de SAB para la determinación de proteína soluble.

Anexo IV: Resultados de las determinaciones analíticas de materias primas y para fermentación

Tabla A1 Resultados de las determinaciones analíticas de ingredientes para la formulación de medio de cultivo.

No. De ingrediente	Muestra	% Azúcares reductores ¹	% Azúcares totales ²	% Proteína Soluble ³
1	Caldo de soya tripticaseína	0.67 ± 0.01	12.43 ± 0.42	*BLD
2	Extracto de carne	0.07 ± 0.00	6.03 ± 0.04	0.00 ± 0.00
3	Extracto de levadura	4.83 ± 0.28	12.32 ± 0.36	0.07 ± 0.04
4	Jarabe de maguey	0.96 ± 0.21	70.80 ± 7.65	*BLD
5	Melaza	2.32 ± 0.03	32.13 ± 5.13	0.03 ± 0.01
6	MRS	38.42 ± 1.08	41.15 ± 4.44	0.09 ± 0.10
7	Pharmamedia	0.24 ± 0.02	1.68 ± 0.01	0.60 ± 0.03
8	Proflo	0.22 ± 0.01	12.82 ± 1.70	0.60 ± 0.01
9	Suero de leche	84.36 ± 0.23	86.30 ± 1.18	0.56 ± 0.03

*BLD=Bajo el límite de detección.

¹(Miller, 1959) ²(Dubois et al., 1956)³(Bradford, 1976)

Los resultados son el promedio de cuatro determinaciones ± desviación estándar.

De acuerdo con la Tabla A1, los resultados obtenidos nos dan una idea del contenido de azúcares reductores, totales y proteína soluble de los 8 ingredientes que se consideran para la formulación de un medio de cultivo, esto tomando como referencia el medio de cultivo MRS, el cual sirve como un control en el análisis experimental. Por tanto, dichos resultados nos sirven como punto de partida para “idear” un medio de cultivo “alternativo” y a menor costo.

Tabla A2 Resultados de contenido de proteína (% p/p) en ingredientes para formulación de medios.

Ingrediente	% Proteína¹	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
Caldo de soya tripticaseína	40.38	0.38	1
Extracto de carne	59.88	0.50	1
Extracto de levadura	54.97	1.01	2
Jarabe de maguey	0	0	0
Melaza	3.28	0.18	5
Caldo MRS	27.25	1.85	7
Pharmamedia	43.88	0.38	1
Proflo	45.27	0.91	2
Suero de leche	8.17	0.16	2

¹ Método Kjendahl (Nielsen, 2017).

Los resultados son el promedio de tres determinaciones $\pm$ desviación estándar.

Tabla A3 Resultados de contenido de ceniza (% p/p) en ingredientes para formulación de medios.

Ingrediente	Ceniza (%)
Caldo de soya tripticaseína	30.79 ± 0.37
Extracto de carne	9.70 ± 0.33
Extracto de levadura	11.54 ± 1.49
Jarabe de maguey	0.02 ± 0.04
Melaza	9.30 ± 0.12
Caldo MRS	13.20 ± 0.51
Pharmamedia	6.04 ± 0.05
Proflo	6.02 ± 0.28
Suero de leche	5.93 ± 0.39

Los resultados son el promedio de dos determinaciones ± desviación estándar.

Anexo V: Cálculos de las concentraciones empleadas en la CMI contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*.

Para las concentraciones en los controles y SLC utilizados para la CMI contra *L. monocytogenes* y *S. aureus* se ocuparon los siguientes materiales:

- Agua destilada estéril.
- Medio de cultivo BHI estéril.
- Solución de nisina a las siguientes concentraciones (0.2 %) 80 mg/mL, (0.4%) 160 mg/mL y (1.6 %) 640 mg/mL.
 - Para la preparación de las soluciones de nisina se consideró lo siguiente: la nisina utilizada Nisaplin ® (DANISCO, Reino Unido) tiene una pureza del 2.5%.
- Suspensión bacteriana de *L. monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* a una concentración de 10^6 UFC/mL
- Medio de cultivo MRS, M1 y M2 estériles y sin inocular, concentrados en SpeedVac a razón de 4:1, los concentrados obtenidos tuvieron 149.55, 92.22 y 85.19 mg/mL de proteína respectivamente, de acuerdo con lecturas en NanoDrop a 280 nm.

Se realizó un ajuste de la suspensión bacteriana, considerando que los pozos tendrán como volumen final 220 μ L y la concentración de los microorganismos indicadores debe quedar en el orden de 10^5 UFC/mL (Tabla A4).

Tabla A4 Ajustes de la suspensión bacteriana para alcanzar una concentración final en el pozo de 10^5 UFC/mL.

Microorganismo indicador	Volumen de la dilución 10^6 (UFC/mL)	Volumen de caldo BHI, agua o SLC/control estéril total	Volumen final con una concentración de 10^5 UFC/mL por pozo
<i>L. monocytogenes</i>	22 μ L	198 μ L	220 μ L
<i>S. aureus</i> ATCC-25923	22 μ L	198 μ L	220 μ L

Posteriormente, se fijó la cantidad de caldo BHI estéril en 50 µL, donde los datos de agua destilada estéril y sustancia antimicrobiana (Control o BLIS) fueron adicionados de acuerdo con cálculos que consideraban la cantidad de proteína requerida en el pozo a un volumen de 220 µL totales (Tabla A5).

Por ejemplo:

Nisina a 20 mg/mL.

Si la nisina tiene una pureza del 2.5%, se estima que hay 2 g en 1 L de solución de nisina.

2 mg → 1000 µL en pozos

0.05 mg → 25 µL solución de nisina de concentración 80 mg/mL

0.05 mg de nisina se aforarán a 0.22 mL (220 µL) en pozo.

$$\frac{0.05 \text{ mg}}{0.22 \text{ mL}} = 0.227 \frac{\text{mg nisina}}{\text{mL pozo}}$$

Para la estimación de 20 mg/mL de proteína en pozo se considera lo siguiente:

20 mg proteína → 1000 µL

X mg proteína → 220 µL (volumen final en pozo)

X = 4.4 mg proteína

Control MRS a 20 mg/mL.

149.55 mg proteína (MRS) → 1000 µL

4.4 mg proteína → X µL

X= 29.42 µL redondeados a 30 µL

(30 µL • 149.55 mg proteína MRS) / 1000 µL = 4.4865

4.437 mg / 0.220 mL vol. pozo = 20.17 mg/mL

Control M1 a 20 mg/mL.

92.22 mg proteína (M1) → 1000 µL

4.4 mg proteína → X µL

X= 47.71 µL redondeados a 48 µL

$(48 \mu\text{L} \cdot 92.22 \text{ mg proteína M1}) / 1000 \mu\text{L} = 4.4266$

$4.4266 \text{ mg} / 0.220 \text{ mL vol. pozo} = 20.12 \text{ mg/mL}$

Control M2 a 20 mg/mL.

85.19 mg proteína (M2) → 1000 µL

4.4 mg proteína → X µL

X= 51.65 µL redondeados a 52 µL

$(52 \mu\text{L} \cdot 85.19 \text{ mg proteína M2}) / 1000 \mu\text{L} = 4.4299$

$4.4299 \text{ mg} / 0.220 \text{ mL vol. pozo} = 20.14 \text{ mg/mL}$

La tabla A5 indica el contenido en los pozos aforados a 220 µL de algunas concentraciones empleadas para llevar a cabo la CMI de *E faecium* y *S.infantarius* contra *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

Tabla A5 Contenido en los pozos aforados a 220 μL en placa ELISA (Corning® Costar®) según el tratamiento analizado.

Tratamientos	Caldo BHI estéril (μL)	Agua destilada estéril (μL)	Suspensión bacteriana ajustada (μL)	Sustancia antimicrobiana (BLIS, μL)	Total (μL)
Control Negativo	50	170	0	0	220
Control Positivo	50	148	22	0	220
Control Nisina 20 mg/mL	50	123	22	25	220
Control MRS 20 mg/mL	50	118	22	30	220
Control M1 40 mg/mL	50	100	22	48	220
Control M2 20 mg/mL	50	96	22	52	220
Muestra 20 mL/mL T0 MRS <i>E. faecium</i>	50	96	22	52	220
Muestra 20 mL/mL T0 M1 <i>E. faecium</i>	50	112	22	36	220
Muestra 20 mL/mL T0 M2 <i>E. faecium</i>	50	99	22	49	220
Muestra 20 mL/mL T0 MRS <i>S. infantarius</i>	50	97	22	51	220
Muestra 20 mL/mL T0 M1 <i>S. infantarius</i>	50	105	22	43	220
Muestra 20 mL/mL T0 M2 <i>S. infantarius</i>	50	106	22	42	220

Anexo VI: Ajustes mediante regresión no lineal para estimar tasa máxima de crecimiento y velocidad específica de consumo de azúcares totales utilizando el software SigmaPlot 14 (Systat Software Inc., EE. UU.)

Lo presentado a continuación, son los resultados arrojados por el programa SigmaPlot 14 mediante regresión no lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros, para el cálculo de la **tasa máxima de crecimiento**:

$$y(t) = y_0 + a * \exp\left[-\exp\left(\frac{-(x - x_0)}{b}\right)\right]$$

BAL: *Enterococcus faecium*.

- **Medio de cultivo MRS.**

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9911	0.9824	0.9559	0.0656	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	0.7496	0.1009	7.4290	0.0176
b	2.6778	0.8778	3.0505	0.0928
x0	4.3159	0.8108	5.3228	0.0335
y0	0.0672	0.0753	0.8919	0.4666

Figura A11 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9975	0.9950	0.9875	0.0575	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	1.2307	0.0673	18.2893	0.0030
b	1.1039	0.4574	2.4134	0.1372
x0	2.7221	0.2028	13.4211	0.0055
y0	0.0992	0.0575	1.7263	0.2264

Figura A12 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9972	0.9944	0.9861	0.0716	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	1.3622	0.0846	16.1091	0.0038
b	1.2405	0.2969	4.1783	0.0528
x0	3.4112	0.2367	14.4091	0.0048
y0	0.0611	0.0716	0.8528	0.4836

Figura A13 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M2.

BAL: *Streptococcus infantarius*.

- Medio de cultivo MRS.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9998	0.9997	0.9992	0.0122	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	0.8876	0.0142	62.3377	0.0003
b	0.9788	0.0628	15.5910	0.0041
x0	3.6690	0.0679	54.0720	0.0003
y0	0.1153	0.0122	9.4609	0.0110

Figura A14 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9998	0.9995	0.9988	0.0176	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	1.1867	0.0204	58.1921	0.0003
b	0.8645	0.1400	6.1763	0.0252
x0	3.0139	0.0420	71.7458	0.0002
y0	0.3654	0.0176	20.8129	0.0023

Figura A15 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9984	0.9967	0.9919	0.0500	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	1.1086	0.0578	19.1736	0.0027
b	0.6237	0.3007	2.0745	0.1737
x0	3.6523	0.3654	9.9965	0.0099
y0	0.0357	0.0500	0.7134	0.5496

Figura A16 Tasa de crecimiento estimada por regresión lineal empleando la ecuación Gompertz de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M2.

Lo presentado a continuación, son los resultados arrojados por el programa SigmaPlot 14 mediante regresión no lineal empleando la ecuación Sigmoideal de 4 parámetros, para el cálculo de la velocidad específica de consumo de azúcares totales:

$$y(t) = y0 + \frac{a}{(1 + \exp(\frac{-(x - x0)}{b}))}$$

BAL: *Enterococcus faecium*.

- Medio de cultivo MRS.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9994	0.9989	0.9972	0.2640	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	10.6704	0.3465	30.7938	0.0011
b	-1.1060	0.1624	-6.8121	0.0209
x0	6.1668	0.1296	47.5835	0.0004
y0	12.2007	0.1922	63.4941	0.0002

Figura A17 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoideal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9969	0.9937	0.9843	0.4010	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	9.7719	1.9643	4.9747	0.0381
b	-2.4165	0.6864	-3.5208	0.0721
x0	3.5311	1.0925	3.2321	0.0839
y0	9.6215	0.3455	27.8497	0.0013

Figura A18 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9977	0.9954	0.9884	0.3469	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	7.1579	0.5166	13.8564	0.0052
b	-1.3510	0.3361	-4.0200	0.0567
x0	5.9889	0.3207	18.6725	0.0029
y0	11.6929	0.2614	44.7339	0.0005

Figura A19 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M2.

BAL: *Streptococcus infantarius*.

- **Medio de cultivo MRS.**

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9948	0.9897	0.9742	0.9927	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	12.9392	1.1475	11.2757	0.0078
b	-1.1343	0.3282	-3.4562	0.0745
x0	7.3793	0.4779	15.4403	0.0042
y0	6.9232	0.7703	8.9875	0.0122

Figura A20 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo MRS.

- **Medio de cultivo M1.**

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9984	0.9969	0.9922	0.2304	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	5.7531	0.3128	18.3923	0.0029
b	-1.3950	0.2422	-5.7586	0.0289
x0	6.7766	0.2743	24.7014	0.0016
y0	11.3983	0.1861	61.2625	0.0003

Figura A21 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

R	Rsqr	Adj Rsqr	Standard Error of Estimate	
0.9967	0.9934	0.9836	0.4004	
	Coefficient	Std. Error	t	P
a	7.0369	0.6269	11.2256	0.0078
b	-1.4237	0.4080	-3.4898	0.0732
x0	5.8620	0.4058	14.4450	0.0048
y0	11.1371	0.3032	36.7319	0.0007

Figura A22 Consumo de azúcares totales estimado por regresión lineal empleando la ecuación Sigmoidal de 4 parámetros en SigmaPlot 14 para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M2.

Anexo VII: Estimación de la $\mu_{\text{máx}}$ y q_s utilizando el software PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 (EE. UU.)

Lo presentado a continuación, son los resultados arrojados desde el tiempo 0 h (inicio de la columna) al tiempo 24 h (final de la columna) en intervalos de 1 h, por el programa PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 mediante la siguiente ecuación para el cálculo de la $\mu_{\text{máx}}$:

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)}$$

BAL: *Enterococcus faecium*.

- Medio de cultivo MRS.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow$$

0.129437466943654544168
0.3369648437135175945167
0.451645434275851697679
0.41820006889403036682
0.32926023720009356292
0.242150581115666575938
0.172718543924486711956
0.12135511131412905547
0.0845835915880605346915
0.0586838393415091186414
0.040602171844032670414
0.0280432244824147843014
0.0193473964114879006794
0.0133382594006928373818
0.00919102534804723874981
0.00633120285359333596
0.00436025515568575870347
0.0030024225257278133976
0.00206722038802849556753
0.0014232165227030851532
0.00097979240179537143702
0.000674501102148312263257
0.000464324179521304515404
0.000319634087161600026807
0.000220029122159038961571

Figura A23 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.001019084940347808666577 \\ 0.414524691161320570599 \\ 1.12291110751008494804 \\ 0.59918120951864867462 \\ 0.256363084963607048806 \\ 0.10540731991430846633 \\ 0.042866151833539021864 \\ 0.017366832062239327297 \\ 0.0070260009271192347129 \\ 0.0028408783557135314822 \\ 0.0011484177306254681045 \\ 0.00046420310175815320306 \\ 0.00018762919341618826516 \\ 0.000075837920102642616356 \\ 0.000030652778103348092995 \\ 0.000012389455739122093118 \\ 0.0000050076526299318104735 \\ 0.000002024025556593685022 \\ 0.81808366284275752834 \cdot 10^{-6} \\ 0.33065829353879213593 \cdot 10^{-6} \\ 0.13364758303660825548 \cdot 10^{-6} \\ 0.54018533979019864625 \cdot 10^{-7} \\ 0.21833556093002924467 \cdot 10^{-7} \\ 0.88248261427838002269 \cdot 10^{-8} \\ 0.35668745881303835304 \cdot 10^{-8} \end{bmatrix}$$

Figura A24 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.00004532100083088187045449 \\ 0.1138763978254426658928 \\ 1.24787585320310021138 \\ 0.95115186854833675189 \\ 0.462823304894019769797 \\ 0.21143879144253469141 \\ 0.095183686190491358442 \\ 0.042644313607106441833 \\ 0.019070358044502379884 \\ 0.0085216215838007800828 \\ 0.0038066313306213787674 \\ 0.0017001826962961950224 \\ 0.00075931511992384701277 \\ 0.00033910632641626996207 \\ 0.00015144122395315254709 \\ 0.000067631624456584304015 \\ 0.00003020330066310025899 \\ 0.000013488339616313386473 \\ 0.0000060236864172064856253 \\ 0.000002690085714366127788 \\ 0.0000012013507853133593649 \\ 0.53650470522324662021 \cdot 10^{-6} \\ 0.23959470984893339928 \cdot 10^{-6} \\ 0.10699929358283275697 \cdot 10^{-6} \\ 0.47784230243223808889 \cdot 10^{-7} \end{bmatrix}$$

Figura A25 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M2.

BAL: *Streptococcus infantarius*.

- Medio de cultivo MRS.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.121685770600209390488 \cdot 10^{-15} \\ 0.0000276797531494256552607 \\ 0.171091944436816884625 \\ 1.04229012314611530823 \\ 0.57589050552043888704 \\ 0.224557568629487717381 \\ 0.0826402200070938359603 \\ 0.0299648514935160546013 \\ 0.0108142339988264996021 \\ 0.00389655039921087138825 \\ 0.0014031932544711396524 \\ 0.00050520331439184603737 \\ 0.00018187923149432212979 \\ 0.000065476973522226314363 \\ 0.000023571649216040246016 \\ 0.0000084857427284702477781 \\ 0.0000030548452759635284214 \\ 0.0000010997358551240475511 \\ 0.39590180496122110324 \cdot 10^{-6} \\ 0.1425235245938430111 \cdot 10^{-6} \\ 0.51308062729894374639 \cdot 10^{-7} \\ 0.18470756242218006256 \cdot 10^{-7} \\ 0.66494195472520195401 \cdot 10^{-8} \\ 0.23937720628776620757 \cdot 10^{-8} \\ 0.86175111170377256547 \cdot 10^{-9} \end{bmatrix}$$

Figura A26 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.79950124788417044909 \cdot 10^{-12} \\ 0.00133292448188963435387 \\ 0.425087308543772870869 \\ 0.63516822270467285105 \\ 0.25964675576880504026 \\ 0.086742089351817260102 \\ 0.027750618923643375585 \\ 0.0087732178415948426794 \\ 0.0027637219672055501822 \\ 0.00086965888999245565123 \\ 0.0002735602412326731746 \\ 0.000086041848414915682657 \\ 0.000027061484742884214338 \\ 0.0000085111615785232967051 \\ 0.0000026768533543495115317 \\ 0.84189874509402014493 \cdot 10^{-6} \\ 0.26478598781523479056 \cdot 10^{-6} \\ 0.83277962306811914142 \cdot 10^{-7} \\ 0.26191789201172377025 \cdot 10^{-7} \\ 0.82375912595627024169 \cdot 10^{-8} \\ 0.25908084787989949152 \cdot 10^{-8} \\ 0.81483632234223359842 \cdot 10^{-9} \\ 0.2562745326126302723 \cdot 10^{-9} \\ 0.80601016742039485773 \cdot 10^{-10} \\ 0.25349861468529338599 \cdot 10^{-10} \end{bmatrix}$$

Figura A27 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

$$\left(\frac{d}{dt} x(t) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.00007695975377096696092695 \\ 0.143439251836490991633 \\ 1.29233539568808387624 \\ 0.931289284699294310197 \\ 0.449678437823163464681 \\ 0.2051270897719191675 \\ 0.092318304528233584636 \\ 0.041364716166011612257 \\ 0.018502409994371350534 \\ 0.0082701858339634399177 \\ 0.0036954491111091161976 \\ 0.0016510478694952252426 \\ 0.00073760809226815030974 \\ 0.00032951857729466641114 \\ 0.00014720714179131155564 \\ 0.000065762075409264572058 \\ 0.000029377923347800824711 \\ 0.000013123999580355005425 \\ 0.0000058628814577543989058 \\ 0.0000026191231860877588847 \\ 0.0000011700399631598654112 \\ 0.5226915113829578331 \cdot 10^{-6} \\ 0.23350177723473124239 \cdot 10^{-6} \\ 0.10431215796964007609 \cdot 10^{-6} \\ 0.46599329510497703093 \cdot 10^{-7} \end{bmatrix}$$

Figura A28 Tasa de crecimiento máxima ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $((d/dt x(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M2.

Lo presentado a continuación, son los resultados arrojados desde el tiempo 0 h (inicio de la columna) al tiempo 24 h (final de la columna) en intervalos de 1 h, por el programa PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 mediante la siguiente ecuación para el cálculo del qs :

$$\left(-\left(\frac{d}{dt} c(t)\right)\right) \cdot \frac{1}{x(t)}$$

BAL: *Enterococcus faecium*.

- Medio de cultivo MRS.

$$\left(-\left(\frac{d}{dt} c(t)\right)\right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.502481574887906586955 \\ 0.9736992061581943756534 \\ 1.55540054675211495302 \\ 2.3095122399263493585 \\ 3.36477090596231254405 \\ 4.47830862408892198254 \\ 4.7301226841314951035 \\ 3.57986421939108335672 \\ 1.99752610175693558257 \\ 0.920475986595059159278 \\ 0.387138204063712036646 \\ 0.157130443666598257371 \\ 0.0630806554066833810071 \\ 0.0252840096869286017783 \\ 0.0101486565161097913827 \\ 0.00408167890477043830931 \\ 0.00164455385760173997899 \\ 0.000663540472778472051373 \\ 0.00026800113917539398668 \\ 0.000108324756168504315364 \\ 0.000043807179262742215856 \\ 0.000017722327992001431402 \\ 0.00000717142998572251873388 \\ 0.00000290246152000743870595 \\ 0.00000117484191452971438348 \end{bmatrix}$$

Figura A29 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $(-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

$$\left(- \left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 6.229367702883142027069 \\ 7.08395384512651950752 \\ 3.28281939437042719309 \\ 1.5024655049728907518 \\ 1.00346500950036518282 \\ 0.78017562047652203856 \\ 0.62055835083207593254 \\ 0.48132198652975615744 \\ 0.35996957840523058554 \\ 0.26031932524816091033 \\ 0.18329926322220683525 \\ 0.12654993149347386975 \\ 0.086159851378612255255 \\ 0.058098255389117923585 \\ 0.038920226185416812393 \\ 0.025958017194777944497 \\ 0.017261790003192035081 \\ 0.011456346703783011856 \\ 0.0075934483561731761211 \\ 0.00502869828065998352 \\ 0.0033283023043794060607 \\ 0.002202038329581208315 \\ 0.0014565243426675204792 \\ 0.00096324854120457435537 \\ 0.00063695856422956909739 \end{bmatrix}$$

Figura A30 Velocidad de consumo máxima ((g azúcar total)/(g biomasa) • h⁻¹) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $(- (d/dt c(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

$$\left(-\left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow$$

1.006072154609216158695
2.014236231123849320831
2.05974331512429976969
1.1796007853164519103
1.01497207267618725008
1.0631193964017972117
1.0475966791952166283
0.85571893801996340304
0.5726142900231954306
0.33011222157313695308
0.17376870438999282716
0.087066723161033008064
0.042541647133130823644
0.020530019885563044889
0.0098480125721889505954
0.0047102883743449443019
0.0022497875020697548512
0.0010738552316241835953
0.0005124025783391928984
0.00024446154507607629936
0.00011662135618187589092
0.000055632741833952697664
0.000026538452622468551934
0.000012659520818911717894
0.0000060388922911328307366

Figura A31 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $(-d/dt \ c(t)) \cdot 1/x(t)$ para *Enterococcus faecium* en medio de cultivo M2.

BAL: *Streptococcus infantarius*.

- Medio de cultivo MRS.

$$\left(- \left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.14747119192532820412 \\ 0.354607860529612569756 \\ 0.821846840449629621502 \\ 0.968797301889598317006 \\ 0.9541789084139136843 \\ 1.38514374723980376208 \\ 2.17601387834519975104 \\ 2.84800101818664411276 \\ 2.66900043329206785693 \\ 1.78030871852112447603 \\ 0.93529752643915931142 \\ 0.43140714765218165866 \\ 0.18715259129253332145 \\ 0.079036591213413465692 \\ 0.032999251915774929414 \\ 0.013712138176224504046 \\ 0.0056864715516937893586 \\ 0.0023562543836133738232 \\ 0.00097600688337322088732 \\ 0.00040422391197146367762 \\ 0.00016740391250110578843 \\ 0.000069326397954359321866 \\ 0.000028709609702260279185 \\ 0.00001188924090642376673 \\ 0.0000049235711050096438394 \end{bmatrix}$$

Figura A32 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total}) / (g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $(- (d/dt c(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo MRS.

- Medio de cultivo M1.

$$\left(- \left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 0.08632412742296377833 \\ 0.173947345387711568419 \\ 0.305642918761016451028 \\ 0.30419394120441257822 \\ 0.35535016406391371305 \\ 0.48975591229079698541 \\ 0.63035222231493026937 \\ 0.66506529950355119962 \\ 0.55262092136540352702 \\ 0.37316835091042677258 \\ 0.21819574398447888135 \\ 0.11708974288963034611 \\ 0.05997280722814577206 \\ 0.029988541320718756522 \\ 0.014815627080392180889 \\ 0.0072760046947782430927 \\ 0.0035628032894107156379 \\ 0.0017420737640681495337 \\ 0.00085120850569745115353 \\ 0.00041577290281514335104 \\ 0.0002030502517159904293 \\ 0.000099155153392188251293 \\ 0.000048418314626334666781 \\ 0.000023642617615826682817 \\ 0.000011544557835651224302 \end{bmatrix}$$

Figura A33 Velocidad de consumo máxima ($(g \text{ azúcar total})/(g \text{ biomasa}) \cdot h^{-1}$) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $(-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t))$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M1.

- Medio de cultivo M2.

$$\left(-\left(\frac{d}{dt} c(t) \right) \right) \cdot \frac{1}{x(t)} \rightarrow \begin{bmatrix} 1.288223117457044445756 \\ 2.451174955170910847017 \\ 2.23288624666490091778 \\ 1.21164142774753430483 \\ 0.999323247167004297233 \\ 0.99710177887416053206 \\ 0.94521024515253531215 \\ 0.76099147612065126685 \\ 0.51503137496955621381 \\ 0.30550841411288004897 \\ 0.16680101876741771557 \\ 0.086910162866732115336 \\ 0.044173933176790961041 \\ 0.022167747217315823899 \\ 0.011052882948377108896 \\ 0.0054931933657271299453 \\ 0.0027256680874136112289 \\ 0.0013513623458576431043 \\ 0.00066972568338220490519 \\ 0.00033184537248188232766 \\ 0.0001644113121606682242 \\ 0.000081452858829738923461 \\ 0.000040352495508386712469 \\ 0.000019990755979723771726 \\ 0.0000099034254088098228084 \end{bmatrix}$$

Figura A34 Velocidad de consumo máxima ((g azúcar total)/(g biomasa) • h⁻¹) estimada por PTC Mathcad® Prime 7.0.0.0 empleando la ecuación $-(d/dt c(t)) \cdot 1/x(t)$ para *Streptococcus infantarius* en medio de cultivo M2.

Anexo VIII: Resultados de las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) mediante análisis estadístico en software SPSS v.25.00

Las lecturas de absorbancia (545 a 630 nm) a las 0, 18 y 24 h con un Stat Fax 2100(Awareness Technology Inc., FL, EE. UU.), fueron normalizadas, para posteriormente procesar en el software SPSS v.25.00 mediante la prueba HSD Tukey con una $p \leq 0.05$.

Lo presentado a continuación, son los resultados arrojados por el programa.

Tabla A6 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

SLC	N	Subconjunto								
		a	b	c	d	e	F	g	h	i
Control negativo	9	0.9333								
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667								
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989								
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000								
SLC T12	45	1.0493								
SLC T24	45	1.0707								
SLC T9	45	1.1231								
SLC T6	45	1.1476	1.1476							
SLC T3	45		1.3984	1.3984						
MRS 35 mg/mL	9			1.5000						
SLC T0	45				1.7969					
MRS 20 mg/mL	9					2.2222				
Nisina 15 mg/mL	9						4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9							5.0078		
Control positivo	9								5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9									6.1578
Sig.		0.206	0.054	0.991	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A7 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio MRS) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concen- tración	N	Subconjunto								
		a	b	c	d	e	F	g	h	i
Control Negativo	9	0.9333								
Nisina 160mg/mL	9	0.9667								
Nisina 40mg/mL	9	0.9989	0.9989							
Nisina 20mg/mL	9	1.0000	1.0000							
35 mg/mL	54	1.0693	1.0693							
20 mg/mL	54	1.1352	1.1352	1.1352						
15 mg/mL	54		1.2524	1.2524	1.2524					
10 mg/mL	54			1.3822	1.3822					
5 mg/mL	54				1.4826					
MRS 35 mg/mL	9				1.5000					
MRS 20 mg/mL	9					2.2222				
Nisina 15 mg/mL	9						4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9							5.0078		
Control Positivo	9								5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9									6.1578
Sig.		0.298	0.051	0.066	0.065	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A8 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

SLC	N	Subconjunto					
		a	b	c	D	E	f
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300					
Control negativo	24	1.0408					
Nisina 160 mg/mL	21	1.0543					
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700					
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144					
SLC T12	69		1.3531				
SLC T0	69		1.4711	1.4711			
MRS 35 mg/mL	9		1.5000	1.5000			
SLC T3	69		1.5051	1.5051			
SLC T24	69		1.5145	1.5145			
SLC T6	69		1.5394	1.5394			
SLC T9	69			1.5847			
Nisina 40 mg/mL	21				3.8043		
Nisina 20 mg/mL	21					4.0457	
Control positivo	24						7.0796
Sig.		0.975	0.067	0.784	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A9 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio MRS) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto							
		a	b	c	d	E	f	g	h
20 mg/mL	126	0.9886							
35 mg/mL	126	0.9896							
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300							
Control Negativo	24	1.0408							
Nisina 160 mg/mL	21	1.0543							
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700							
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144							
MRS 35 mg/mL	9		1.5000						
15 mg/mL	54			1.8811					
10 mg/mL	54				2.1789				
5 mg/mL	54					2.7831			
Nisina 40 mg/mL	21						3.8043		
Nisina 20 mg/mL	21							4.0457	
Control Positivo	24								7.0796
Sig.		0.638	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A10 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio MRS) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

SLC	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	g
Control negativo	9	0.9333						
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667						
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989						
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000						
SLC T9	45	1.0011						
SLC T12	45	1.0104						
SLC T6	45	1.0200						
SLC T24	45	1.0240						
SLC T3	45	1.1096						
SLC T0	45		1.3918					
MRS 35 mg/mL	9		1.5000					
MRS 20 mg/mL	9			2.2222				
Nisina 15 mg/mL	9				4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9					5.0078		
Control positivo	9						5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9							6.1578
Sig.		0.316	0.951	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A11 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio MRS) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concentración	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	7
Control Negativo	9	0.9333						
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667						
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989						
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000						
15 mg/mL	54	1.0339						
10 mg/mL	54	1.0694						
35 mg/mL	54	1.0759						
20 mg/mL	54	1.1294						
5 mg/mL	54	1.1554						
MRS 35 mg/mL	9		1.5000					
MRS 20 mg/mL	9			2.2222				
Nisina 15 mg/mL	9				4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9					5.0078		
Control Positivo	9						5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9							6.1578
Sig.		0.056	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A12 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio MRS) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

SLC	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	g
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300						
Control negativo	24	1.0408						
Nisina 160 mg/mL	21	1.0543						
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700						
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144						
SLC T0	69		1.4873					
MRS 35mg/mL	9		1.5000					
SLC T24	69		1.5557	1.5557				
SLC T3	69		1.5723	1.5723	1.5723			
SLC T9	69		1.5909	1.5909	1.5909			
SLC T6	69			1.7160	1.7160			
SLC T12	69				1.7651			
Nisina 40 mg/mL	21					3.8043		
Nisina 20 mg/mL	21						4.0457	
Control positivo	24							7.0796
Sig.		0.981	0.902	0.270	0.065	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A13 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio MRS) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto							
		a	b	c	d	E	f	g	h
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300							
Control Negativo	24	1.0408							
Nisina 160 mg/mL	21	1.0543							
35 mg/mL	126	1.0695							
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700							
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144							
20 mg/mL	126	1.1788							
MRS 35 mg/mL	9		1.5000						
15 mg/mL	54			1.9533					
10 mg/mL	54				2.3361				
5 mg/mL	54					2.8428			
Nisina 40 mg/mL	21						3.8043		
Nisina 20 mg/mL	21							4.0457	
Control Positivo	24								7.0796
Sig.		0.406	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A14 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*

SLC	N	Subconjunto							
		a	b	c	d	e	f	G	h
Control negativo	9	0.9333							
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667							
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989	0.9989						
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000	1.0000						
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933						
SLC T24	45	1.1533	1.1533						
SLC T9	45	1.1671	1.1671	1.1671					
SLC T6	45		1.2602	1.2602					
SLC T12	45		1.2720	1.2720					
SLC T3	45			1.4413	1.4413				
SLC T0	45				1.6773				
Nisina 15 mg/mL	9					4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9						5.0078		
Control positivo	9							5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9								6.1578
Sig.		0.195	0.052	0.050	0.183	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A15 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M1) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concentración	N	Subconjunto							
		a	b	c	d	E	f	g	h
Control Negativo	9	0.9333							
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667	0.9667						
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989	0.9989						
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000	1.0000						
40 mg/mL	54	1.0435	1.0435						
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933						
20 mg/mL	54	1.1835	1.1835	1.1835					
15 mg/mL	54		1.2298	1.2298					
10 mg/mL	54			1.4194					
5 mg/mL	54				1.7665				
Nisina 15 mg/mL	9					4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9						5.0078		
Control Positivo	9							5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9								6.1578
Sig.		0.120	0.078	0.185	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A16 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

SLC	N	Subconjunto					
		a	b	c	D	E	f
Control negativo	9	0.9433					
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956					
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300					
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700					
M1 40 mg/mL	9	1.0933					
M1 35 mg/mL	9	1.0933					
M1 20 mg/mL	9	1.1122					
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144					
M1 15 mg/mL	9		1.3844				
SLC T0	36		1.4111				
SLC T24	36		1.4222				
SLC T9	36		1.4336				
SLC T12	36		1.4797	1.4797			
SLC T6	36		1.4806	1.4806			
SLC T3	36			1.6303			
Nisina 40 mg/mL	9				5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9					6.0656	
Control positivo	9						8.1800
Sig.		0.073	0.904	0.212	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A17 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M1) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto							
		a	b	c	d	E	f	g	h
Control Negativo	9	0.9433							
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956							
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300	1.0300						
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700						
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933						
M1 35 mg/mL	9	1.0933	1.0933						
M1 20 mg/mL	9	1.1122	1.1122						
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144	1.1144						
40 mg/mL	54		1.1959						
M1 15 mg/mL	9			1.3844					
33 mg/mL	54			1.4670	1.4670				
20 mg/mL	54				1.5861	1.5861			
24 mg/mL	54					1.6559			
Nisina 40 mg/mL	9						5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9							6.0656	
Control Positivo	9								8.1800
Sig.		0.079	0.104	0.967	0.620	0.993	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A18 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*

SLC	N	Subconjunto					
		a	b	c	D	E	f
Control negativo	9	0.9333					
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667					
SLC T9	45	0.9949					
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989					
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000					
SLC T12	45	1.0071					
SLC T6	45	1.0073					
SLC T24	45	1.0102					
SLC T3	45	1.0309					
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933				
SLC T0	45		1.2856				
Nisina 15 mg/mL	9			4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9				5.0078		
Control positivo	9					5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9						6.1578
Sig.		0.592	0.275	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A19 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M1) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concentración	N	Subconjunto				
		a	b	C	D	f
Control Negativo	9	0.9333				
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667				
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989				
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000				
40 mg/mL	54	1.0054				
15 mg/mL	54	1.0104				
20 mg/mL	54	1.0511				
10 mg/mL	54	1.0559				
M1 40 mg/mL	9	1.0933				
5 mg/mL	54	1.1572				
Nisina 15 mg/mL	9		4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9			5.0078		
Control Positivo	9				5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9					6.1578
Sig.		0.095	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A20 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M1) empleados para la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

SLC	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	g
Control negativo	9	0.9433						
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956	0.9956					
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300	1.0300					
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700					
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933					
M1 35 mg/mL	9	1.0933	1.0933					
M1 20 mg/mL	9	1.1122	1.1122					
Nisina 100 mg/mL	9		1.1144					
SLC T6	36			1.3422				
SLC T12	36			1.3497	1.3497			
SLC T9	36			1.3567	1.3567			
M1 15 mg/mL	9			1.3844	1.3844			
SLC T3	36			1.4500	1.4500			
SLC T0	36			1.4922	1.4922			
SLC T24	36				1.5136			
Nisina 40 mg/mL	9					5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9						6.0656	
Control positivo	9							8.1800
Sig.		0.053	0.554	0.158	0.073	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A21 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M1) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	g
Control Negativo	9	0.9433						
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956	0.9956					
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300	1.0300					
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700					
M1 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933					
M1 35 mg/mL	9	1.0933	1.0933					
M1 20 mg/mL	9	1.1122	1.1122					
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144	1.1144					
40 mg/mL	54		1.1641					
M1 15 mg/mL	9			1.3844				
33 mg/mL	54			1.4044				
20 mg/mL	54			1.4898	1.4898			
24 mg/mL	54				1.6113			
Nisina 40 mg/mL	9					5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9						6.0656	
Control Positivo	9							8.1800
Sig.		0.051	0.059	0.742	0.506	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A22 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

SLC	N	Subconjunto					
		a	b	c	D	E	f
Control negativo	9	0.9333					
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667					
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989					
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000					
SLC T12	45	1.0167					
SLC T9	45	1.0189					
SLC T24	45	1.0278	1.0278				
SLC T6	45	1.0391	1.0391				
M2 40 mg/mL	9	1.0989	1.0989				
SLC T3	45	1.1373	1.1373				
SLC T0	45		1.2367				
Nisina 15 mg/mL	9			4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9				5.0078		
Control positivo	9					5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9						6.1578
Sig.		0.078	0.062	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A23 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M2) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concentración	N	Subconjunto				
		a	b	C	D	e
Control Negativo	9	0.9333				
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667				
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989				
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000				
15 mg/mL	54	1.0431				
10 mg/mL	54	1.0700				
40 mg/mL	54	1.0702				
5 mg/mL	54	1.0893				
M2 40 mg/mL	9	1.0989				
20 mg/mL	54	1.1244				
Nisina 15 mg/mL	9		4.6656			
Nisina 10 mg/mL	9			5.0078		
Control Positivo	9				5.8089	
Nisina 5 mg/mL	9					6.1578
Sig.		0.139	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A24 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

SLC	N	Subconjunto									
		a	b	c	d	e	f	g	h	i	j
Control negativo	9	0.9433									
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956	0.9956								
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300	1.0300								
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700								
M2 40 mg/mL	9	1.0989	1.0989								
Nisina 100 mg/mL	9		1.1144								
SLC T0	36			1.3981							
M2 35 mg/mL	9			1.4489	1.4489						
SLC T12	36			1.5172	1.5172	1.5172					
M2 20 mg/mL	9				1.6067	1.6067	1.6067				
SLC T3	36					1.6508	1.6508				
SLC T24	36						1.7175				
SLC T9	36						1.7442				
CFS T6	36						1.7456				
M2 15 mg/mL	9							1.9722			
Nisina 40 mg/mL	9								5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9									6.0656	
Control positivo	9										8.1800
Sig.		0.075	0.461	0.457	0.065	0.252	0.194	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A25 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Enterococcus faecium* con medio M2) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto								
		a	b	c	d	e	F	g	h	i
Control Negativo	9	0.9433								
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956	0.9956							
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300	1.0300							
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700							
M2 40 mg/mL	9	1.0989	1.0989							
Nisina 100 mg/mL	9		1.1144							
40 mg/mL	54			1.3265						
M2 35 mg/mL	9			1.4489	1.4489					
20 mg/mL	54				1.5480	1.5480				
M2 20 mg/mL	9				1.6067	1.6067				
33 mg/mL	54					1.6924				
24 mg/mL	54						1.9487			
M2 15 mg/mL	9						1.9722			
Nisina 40 mg/mL	9							5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9								6.0656	
Control positivo	9									8.1800
Sig.		0.080	0.456	0.403	0.070	0.150	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin indican diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A26 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

SLC	N	Subconjunto		
		a	B	c
Control negativo	9	0.9333		
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667		
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989		
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000		
SLC T12	45	1.0180		
SLC T0	45	1.0240		
SLC T3	45	1.0271		
SLC T24	45	1.0302		
SLC T9	45	1.0320		
M2 40 mg/mL	9	1.0989		
SLC T6	45	1.2438		
Nisina 15 mg/mL	9		4.6656	
Nisina 10 mg/mL	9		5.0078	
Control positivo	9			5.8089
Nisina 5 mg/mL	9			6.1578
Sig.		0.932	0.864	0.846

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A27 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M2) en la determinación de la CMI VS *Listeria monocytogenes*.

Concentración	N	Subconjunto		
		1	2	3
Control Negativo	9	0.9333		
Nisina 160 mg/mL	9	0.9667		
Nisina 40 mg/mL	9	0.9989		
Nisina 20 mg/mL	9	1.0000		
10 mg/mL	54	1.0141		
5 mg/mL	54	1.0322		
40 mg/mL	54	1.0474		
20 mg/mL	54	1.0541		
M2 40 mg/mL	9	1.0989		
15 mg/mL	54	1.1648		
Nisina 15 mg/mL	9		4.6656	
Nisina 10 mg/mL	9		5.0078	
Control Positivo	9			5.8089
Nisina 5 mg/mL	9			6.1578
Sig.		0.993	0.854	0.836

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A28 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M2) empleados para la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

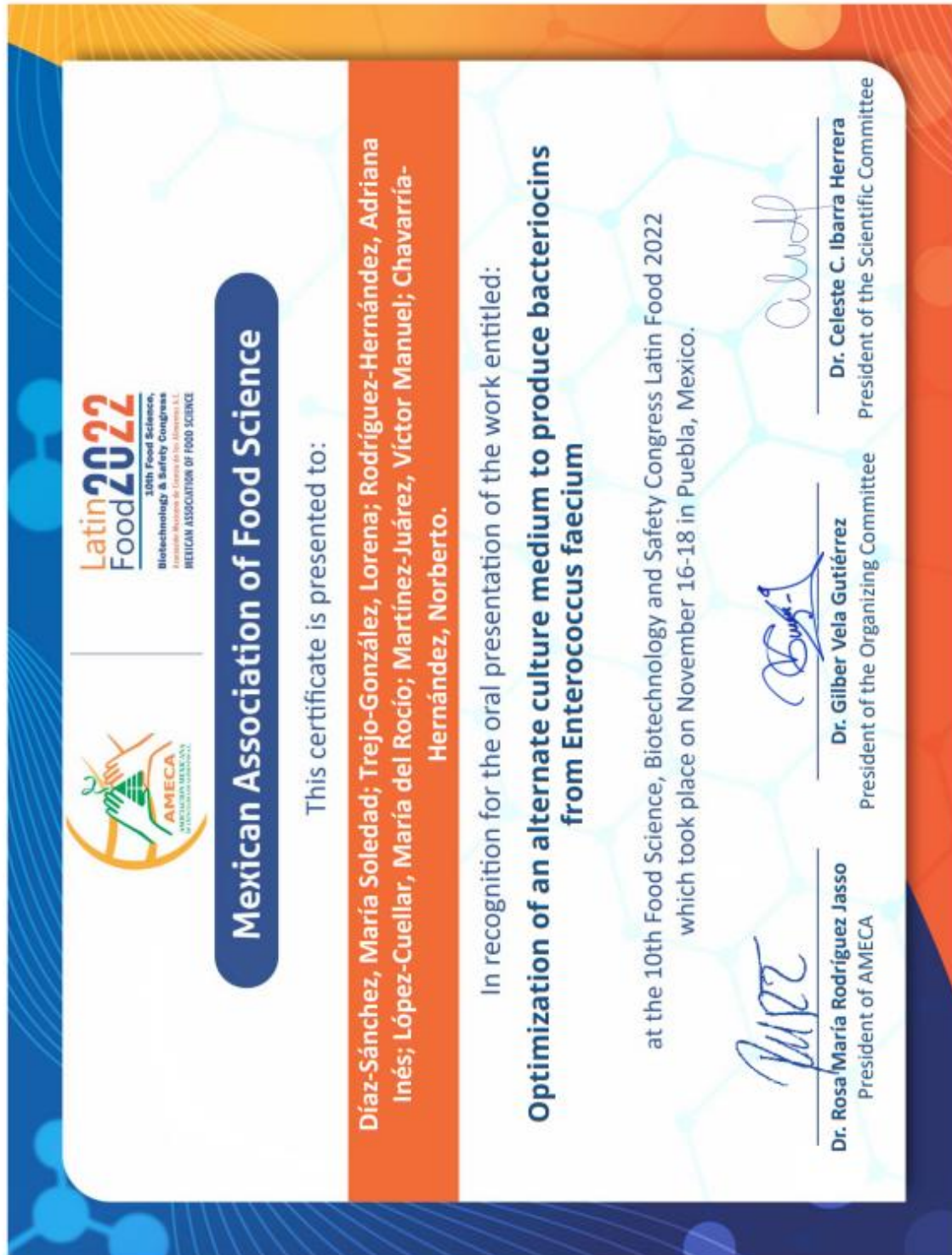
SLC	N	Subconjunto								
		a	b	c	d	e	F	g	h	i
Control negativo	9	0.9433								
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956								
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300								
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700								
M2 40 mg/mL	9	1.0933								
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144								
SLC T24	36		1.3586							
SLC T12	36		1.3978							
M2 35 mg/mL	9		1.4489	1.4489						
SLC T9	36		1.4636	1.4636						
M2 20 mg/mL	9			1.6067	1.6067					
SLC T6	36			1.6353	1.6353					
SLC T3	36				1.7747	1.7747				
SLC T0	36					1.8325	1.8325			
M2 15 mg/mL	9						1.9722			
Nisina 40 mg/mL	9							5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9								6.0656	
Control positivo	9									8.1800
Sig.		0.142	0.893	0.065	0.164	1.000	0.473	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en el/los controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.

Tabla A29 Resultados obtenidos de la prueba de HSD Tukey en SPSS v.25.00 en las concentraciones empleadas en controles bióticos y abióticos (SLC obtenidos en cinética de fermentación de *Streptococcus infantarius* con medio M2) en la determinación de la CMI VS *Staphylococcus aureus*.

Concentración	N	Subconjunto						
		a	b	c	d	e	F	g
Control Negativo	9	0.9433						
Nisina 160 mg/mL	9	0.9956						
Nisina 80 mg/mL	9	1.0300						
Nisina 120 mg/mL	9	1.0700	1.0700					
M2 40 mg/mL	9	1.0933	1.0933					
Nisina 100 mg/mL	9	1.1144	1.1144					
40 mg/mL	54		1.2435					
M2 35 mg/mL	9			1.4489				
20 mg/mL	54			1.5030				
33 mg/mL	54			1.5785				
M2 20 mg/mL	9			1.6067				
M2 15 mg/mL	9				1.9722			
24 mg/mL	54				1.9833			
Nisina 40 mg/mL	9					5.2233		
Nisina 20 mg/mL	9						6.0656	
Control Positivo	9							8.1800
Sig.		0.148	0.133	0.257	1.000	1.000	1.000	1.000

- Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
- Cada subconjunto contiene los valores sin diferencia estadística significativa $p < 0.05$, por efecto de la CMI en la concentración empleada en controles/SLC evaluados del medio de cultivo y microorganismo patógeno.



9.1.- Referencias bibliográficas.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350-356. <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Horwitz Willian, & Latimer, G. W. (2012). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, (19.^a ed., Vol. 1). AOAC International.
- Ismail, B. (2017). ASH content determination. En *Food science text series* (pp. 117-119). https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_11
- Miller, G. L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3), 426-428. <https://doi.org/10.1021/ac60147a030>
- Nielsen, S. S. (2017). Protein nitrogen determination. En *Food Analysis Laboratory Manual. Food Science Text Series*. (pp. 131-135). https://doi.org/10.1007/978-3-319-44127-6_13