



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

**Instituto de Ciencias Agropecuarias
Área Académica de Ingeniería en Alimentos**

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

T E S I S

Que para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

PRESENTA:

Ing. en Alimentos

Wendy Yazmín Sánchez Reyes

Dirección:

Dr. Norberto Chavarría Hernández

Co-Dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández



Tulancingo de Bravo, Hgo., Noviembre 2014

AGRADECIMIENTOS

A mi madre que desde el inicio de mi vida ha estado a mi lado cuidándome y alentándome, por su incansable paciencia y amor y sobre todo por motivarme para dar siempre lo mejor de mí.

A mi esposo por motivarme para la culminación de este trabajo, por su amor incondicional y por alegrar mis días a su lado.

A mi hermano por su ayuda incondicional y a mis sobrinos por cada una de las sonrisas que me regalan, los amo.

A mis directores de tesis, Dr. Norberto Chavarría por sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias, a la Dra. Adriana Rodríguez por su constante y paciente seguimiento. Agradezco a ambos por su asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante el desarrollo del presente trabajo y sobre todo por la amistad brindada y la confianza que depositaron en mí al invitarme a pertenecer a su grupo de trabajo.

A todas aquellas personas que contribuyeron para la realización de esta investigación, por la ayuda, facilidades y conocimientos científicos brindados, en especial al Dr. Jaime Ortega, Dr. Javier Piloni, Dr. Víctor Martínez, Dra. Gloria Díaz, Dra. Rocío Cuellar, M. en C. Ivonne Flores, porque sin su apoyo para la realización de este trabajo el camino para lograr los objetivos se hubiese tornado sinuoso.

RESUMEN

La industria alimentaria está interesada en alternativas para el control de microorganismos mediante la bioconservación, por tal motivo el papel de las bacteriocinas, péptidos antimicrobianos producidos por bacterias ácido lácticas (BAL), es sobresaliente. En el presente trabajo se usó la BAL *Streptococcus infantarius* (BAL1) aislada del *pozol*, bebida tradicional fermentada, para la producción de compuestos antimicrobianos (CAM), las fermentaciones se realizaron por lote en reactor de 3 L usando medios de cultivo con melaza. El trabajo se dividió en dos etapas, la primera consistió en la producción y evaluación de la actividad antimicrobiana (AaM) de los CAM en medio con melaza 4% (MMP) a condiciones de 200 rpm, aireación 1 L/min y 30 °C, mientras que la segunda etapa se enfocó en la purificación y caracterización preliminar de dichos compuestos. En la caracterización bioquímica, la BAL1 dio positivo para las pruebas α -Galactosidasa y Voges Proskauer mientras que dio negativo para β -Glucuronidasa, β -Galactosidasa y β -Hemólisis. Azúcares como ribosa, arabinosa, manitol, sorbitol e inulina fueron hidrolizados resultando en la acidificación del medio. El crecimiento de BAL1 exhibió una breve fase lag y la fase exponencial terminó a las 6 h alcanzándose la máxima concentración de biomasa (1.17 g/L, Desviación estándar, DE=0.17) que permaneció sin variaciones significativas (ANOVA, $p \leq 0.05$) hasta el final del proceso. La $\mu_{\text{máx}}$ fue 0.28 h⁻¹. Como resultado de la producción de ácido láctico durante las fermentaciones –debido a que las bacterias del género *Streptococcus* son homolácticas-, éstas mostraron un descenso del pH con el tiempo, el cual al iniciar la fermentación fue 6.2 (DE=0.1) correspondiente a 3.68 g_{ácido láctico}/L (DE=0.09), mientras que a las 9 h, éste ya era 4.1 (DE=0.1) (7.53 g_{ácido láctico}/L, DE=0.7) sin cambios posteriores significativos. Para la evaluación de la AaM se empleó *Listeria monocytogenes* como indicador registrándose la máxima actividad antimicrobiana a las 6 h en medio MMP (8,624 UA/mL, DE=2,730) la cual disminuyó drásticamente al final de la fermentación (a

t=15 h, 4,691 UA/mL (DE=1,497)). Por otro lado, la máxima actividad exhibida en MRS fue de 10,600 UA/mL siendo $(10,600/8,624)= 1.23$ veces la determinada en medio MMP. Como resultado del tratamiento con proteinasa K se obtuvo una pérdida total de la AaM, confirmando así la naturaleza peptídica de los CAM producidos por BAL1. Referente a la concentración mínima inhibitoria (CMI), ésta fue de 20 UA/mL logrando inhibir a *L. monocytogenes* por 24 h con incubación a 35 °C, mientras que con 80 UA/mL ésta fue inhibida hasta 48 h. La electroforesis SDS-PAGE de las fracciones parcialmente purificadas de los caldos de fermentación de BAL1, reveló una banda con un peso molecular cerca de 9 kDa, la cual mostró gran actividad contra *L. monocytogenes*. El método de purificación de tres pasos que se propone en el presente estudio: 1º Precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona, 2º Cromatografía de filtración en gel, y 3º RP-HPLC, permitió la obtención de bandas más limpias lo cual sienta las bases para que en el corto plazo se pueda dilucidar la estructura primaria de los compuestos antimicrobianos producidos por BAL1.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	ii
Resumen.....	iii
Índice general.....	iv
Índice de cuadros.....	vii
Índice de figuras.....	viii
Nomenclatura.....	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Bacterias Acido Lácticas (BAL).....	3
2.1.1 Metabolitos antimicrobianos de las BAL.....	5
2.2 Bacteriocinas.....	6
2.2.1 Clasificación.....	7
2.2.1.1 Clase I o Lantibióticos.....	7
2.2.1.2 Clase II o No lantibióticos.....	8
2.2.1.3 Clase III.....	9
2.2.1.4 Clase IV.....	9
2.2.2 Modo de Acción.....	11
2.2.3 Biosíntesis.....	13
2.2.4 Bacteriocinas vs. antibióticos.....	14
2.2.5 Aplicación de las bacteriocinas en la industria alimentaria.....	15
2.2.5.1 Aplicación <i>Ex Situ</i>	17
2.2.5.2 Aplicación <i>In Situ</i>	18
2.2.6 Purificación de bacteriocinas.....	19
2.3 Producción de bacteriocinas en medios complejos alternos.....	24
2.3.1 Melaza.....	24
3. ANTECEDENTES.....	27
4. JUSTIFICACIÓN.....	28
5. OBJETIVOS.....	29

5.1.1	Objetivo General.....	29
5.1.2	Objetivos específicos.....	29
6.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	30
7.	HIPOTESIS	32
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	33
8.1	Material biológico	33
8.1.1	Bacteria productora de compuestos antimicrobianos	33
8.1.2	Caracterización bioquímica de la BAL1	33
8.1.3	Bacteria indicadora de actividad antimicrobiana	34
8.2	Medios de cultivo	34
8.3	Fermentación en biorreactor	34
8.3.1	Condiciones de fermentación	34
8.3.2	Concentración de biomasa (X)	36
8.3.3	Fermentación en matraz.....	36
8.4	Actividad antimicrobiana	37
8.4.1	Concentración de la actividad antimicrobiana	37
8.4.2	Evaluación de la actividad antimicrobiana	37
8.4.3	Cuantificación de la actividad antimicrobiana	38
8.4.4	Efecto de proteasas sobre la actividad antimicrobiana.....	39
8.5	Contenido de ácido láctico	39
8.6	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	40
8.7	Purificación de sustancias con actividad antimicrobiana.....	41
8.7.1	Determinación del porcentaje de saturación de sulfato de amonio	41
8.7.2	Precipitación con sulfato de amonio	42
8.7.3	Precipitación con acetona.....	43
8.7.4	Eliminación de sales por diálisis	43
8.7.5	Cromatografía de filtración en gel.....	43
8.7.6	RP-HPLC.....	45
8.7.7	Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida	46
8.7.8	Actividad antimicrobiana en geles de poliacrilamida.....	47
8.8	Análisis estadístico.....	47
9.	RESUTADOS Y DISCUSIONES	48
9.1	Caracterización bioquímica de la BAL1.....	48
9.2	Fermentación en biorreactor	50

9.2.1	Evolución de la biomasa de BAL1	50
9.2.2	Evolución de pH y concentración de ácido láctico	53
9.3	Evolución de la actividad antimicrobiana.....	56
9.3.1	Efecto de la proteinasa K sobre la actividad antimicrobiana.....	59
9.3.2	Concentración mínima inhibitoria.....	60
9.4	Purificación de compuestos antimicrobianos	62
10.	CONCLUSIONES	66
11.	RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES	67
12.	ANEXOS	68
13.	BIBLIOGRAFÍA	74

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación de bacteriocinas y microorganismos productores.	10
Cuadro 2. Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos.	14
Cuadro 3. Aplicaciones Industriales de bacteriocinas producidas por compañías internacionales.....	18
Cuadro 4. Aplicación de cultivos productores de bacteriocinas en alimentos.....	19
Cuadro 5. Estrategias de purificación de algunas bacteriocinas de BAL.....	21
Cuadro 6. Composición de la melaza.....	25
Cuadro 7. Comparativo de resultados para pruebas bioquímicas de la BAL1 obtenidos mediante sistema API 20 Strep (presente trabajo) y algunos datos reportados por otros autores para <i>Streptococcus infantarius</i>	48
Cuadro 8. Cinética de crecimiento de <i>L. monocytogenes</i> en agar Oxford, en contacto con sobrenadante concentrado libre de biomasa (MRS, t=6 h) producido por BAL1 a diferentes concentraciones.....	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales rutas metabólicas de las BAL: (A) Fermentación homoláctica; (B) Fermentación heteroláctica.	4
Figura 2. Esquema de diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos	13
Figura 3. Alternativas para la incorporación de bacteriocinas en los alimentos.	17
Figura 4. Fermentador autoclavable de 3L Applikon Z61103CT04 y bioconsola ADI 1030 (Laboratorio de Biotecnología, ICAp, UAEH).	35
Figura 5. Diluciones 2 ⁿ de sobrenadante concentrado para cuantificación de la AaM (método de la dilución crítica).	38
Figura 6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	41
Figura 7. Cromatografía de filtración en gel: (A) Preparación de columna; (B) Inyección de Fracción Ib; (C) Conexión de columna a cromatógrafo Biologic HR Workstation; (D) Recolección de fracciones.	44
Figura 8. Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity (Laboratorio de Microbiología, ICAp, UAEH).	45
Figura 9. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).	46
Figura 10. Detección de actividad enzimática o fermentación de azúcares en sistema API 20 Strep, compuesto por 20 microtubos.	50
Figura 11. Cinética de crecimiento de la BAL1 en medio de cultivo MMP que contiene 4% p/v melaza, en fermentaciones por cuadruplicado en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30	

°C. a) Evolución de la concentración de biomasa mostrando el mejor ajuste de todos los datos al modelo Sigmoidal de 4 parámetros (Ec. 3). Con base en la Ecuación 3, predicciones de: b) velocidad de producción de biomasa (g/(L h)), y c) velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).52

Figura 12. Cinética de producción de ácido láctico durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo con 4% p/v melaza, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30 °C. a) Evolución de la concentración de ácido láctico mostrando el mejor ajuste de los datos al modelo Sigmoidal de 4 parámetros (Ecuación 4); b) velocidad específica de producción de ácido láctico ($g_{\text{ácido láctico}}/(g_{\text{biomasa}} h)$); y c) evolución del pH durante las fermentaciones.....54

Figura 13. Cinética de actividad antimicrobiana durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo MMP con 4% p/v melaza, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30 °C. Se presentan también los resultados correspondientes cuando se usó medio MRS.56

Figura 14. Actividad bacteriocina producida por *S. thermophilus* ACA-DC 0040, en cultivo por lote, usando caldo Elliker modificado, a 37 °C y pH controlado en 6.2.....57

Figura 15. Producción de bacteriocina R1333 (AU/mL) por *L. sakei* R1333 creciendo en MRS con (\square) y sin (Δ) Tween 80.58

Figura 16. Efecto del tratamiento con proteinasa K (1 mg/mL) sobre la actividad antimicrobiana de CAM contra *L. monocytogenes*. a) Pérdida de actividad antimicrobiana por efecto de digestión con proteinasa K; b) Control negativo (sobrenadante concentrado sin tratamiento con proteinasa K; c) Control positivo (proteinasa K, 1 mg/mL + agua).59

Figura 17. Cromatograma RP-HPLC de Fracción IIb en una columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4.6 x 50 mm x 2.7 μ m), eluida mediante

solución A (30% acetonitrilo / 0.1% TFA) y B (agua destilada / 0.1% TFA)
con un flujo de 0.5 mL/min.62

Figura 18. Cromatograma RP-HPLC de Pediocina (Sigma Aldrich®) en
una columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4.6 × 50 mm × 2.7 μm), eluida
mediante solución A (30% acetonitrilo / 0.1% TFA) y B (agua destilada /
0.1% TFA) con un flujo de 0.5 mL/min.63

Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE: 1) Gel 13-16% teñido con azul de
Coomassie donde a) Fracción Ib; b) pediocina Sigma Aldrich®; 2) Zonas
de inhibición de *Listeria monocytogenes* en gel correspondientes a
Fracción Ib (a) y pediocina Sigma Aldrich® (b).64

Figura 20. Purificación de CAM producidos por la BAL 1 (*Streptococcus
infantarius*) mediante método de tres pasos: 1) Marcador molecular
(Biorad®). 2) Gel 13-16% (a y b), gel 16.5% (c) teñido con azul de
Coomassie donde a) Precipitación doble con (NH₄)₂SO₄ y acetona
(Fracción Ib); b) Cromatografía de filtración en gel (Fracción IIb); c) RP-
HPLC (Fracción IIIb). 3) Zonas de inhibición de *Listeria monocytogenes*
en gel correspondientes a fracción Ib, IIb y IIIb.65

NOMENCLATURA

AaM	Actividad antimicrobiana	(UA/mL)
ANOVA	Análisis de varianza	
AU	Unidades de actividad	
BAL	Bacterias ácido lácticas	
BAL1	<i>Streptococcus infantarius</i> , aislada de pozol	
BHI	Infusión cerebro corazón	
CAM	Compuestos antimicrobianos	
CMI	Concentración mínima inhibitoria	
DE	Desviación estándar	
FDA	Food and Drug Administration	
GRAS	Generally Recognized as Safe	
kDa	Kilodaltones	
<i>Lm</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	
MMP	Medio de producción con 4% melaza	
MnCl ₂	Cloruro de Manganeso	
MRS	Man, Rogosa y Sharpe	
NaCl	Cloruro de sodio	
NaOH	Hidróxido de sodio	
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio	
OD	Oxígeno disuelto	
PM	Peso molecular	(kDa)
psig	Unidad de presión manométrica, libra fuerza por pulgada cuadrada	(lb _f /in ²)
p/v	Relación peso/volumen	(%)
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa	
rpm	Revoluciones por minuto	

SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio	
UFC	Unidad formadora de colonias	
v/v	Relación volumen/volumen	(%)
X	Concentración de biomasa	(g/L)
$\mu_{\text{máx}}$	Máxima velocidad específica de crecimiento	(h ⁻¹)

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente los consumidores exigen productos frescos, nutritivos, de costo accesible, pero sobre todo, inocuos y naturales. Esta demanda ha estimulado la búsqueda de alternativas en el campo de la bioconservación, cuyo objetivo es emplear la microbiota natural de alimentos y/o los productos metabólicos de ésta, con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y extender la vida de anaquel (Hequet et al., 2007). Por otra parte, las bacterias ácido lácticas (BAL) consideradas por la FDA (*Food and Drug Administration*, USA) como bacterias GRAS (*Generally Recognized As Safe*) han sido utilizadas desde tiempos remotos en la elaboración de alimentos fermentados, con el objetivo de proporcionar sabor, color y aroma característicos durante las fermentaciones. Aunado a esto, las BAL tienen capacidad de producir compuestos que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos, como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, entre otros, lo que hace atractivo el uso de estas bacterias en la industria de los alimentos en el marco de la bioconservación (Botina, Zimmermann, & Vanega, 2008).

Específicamente, la producción de bacteriocinas a partir de BAL es un proceso exigente debido a la necesidad de contar con medios de crecimiento ricos en nutrientes (i.e., carbohidratos, ácidos nucleicos, minerales, vitaminas y proteínas o aminoácidos; (Arauz et al., 2011)) en procesos sustentables. En estudios a nivel laboratorio, frecuentemente las BAL son cultivadas en medios comerciales estándares (V. gr., MRS y M17), pero el uso de estos medios es caro en sistemas de producción a gran escala. Por tal motivo, es de interés para la industria desarrollar medios alternativos que mejoren o igualen las características y rendimientos de los ya existentes y que además, sean de bajo costo (Trinetta, Rollini, & Manzoni, 2008). Una alternativa es el uso de melazas (subproducto de la industria azucarera) que son una fuente rica en nutrientes, principalmente carbohidratos, y que actualmente se han aprovechado muy poco en la producción de bacteriocinas o sustancias relacionadas (Metsoviti et al., 2011). En contraste

las melazas han sido ampliamente utilizadas en fermentaciones para la producción de etanol y ácido láctico (Dumbrepatil, Adsul, Chaudhari, Khire, & Gokhale, 2007; Wee, Kim, Yun, & Ryu, 2004).

Por otro lado a pesar de que las bacteriocinas de BAL han sido ampliamente estudiadas en los últimos años, son relativamente pocos los estudios que describen su estructura bioquímica. Esto puede ser debido a los desafíos asociados con la purificación de estos péptidos antimicrobianos, como la necesidad de utilizar medios complejos para el crecimiento de las BAL, la heterogeneidad que pueden presentar las bacteriocinas y los bajos rendimientos obtenidos, entre otros (Carolissen-Mackay, Arendse, & Hastings, 1997). Por esta razón, los protocolos de purificación son específicos para cada tipo de bacteriocina, precisando que tengan que ser diseñados para cada una de ellas (Balciunas et al., 2013). Esto explica en gran medida porque la nisina actualmente es la única bacteriocina que se distribuye comercialmente y que es empleada como un aditivo alimentario aprobada por la FDA.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Bacterias Acido Lácticas (BAL)

Las BAL representan un amplio grupo heterogéneo constituido por cocos y bacilos de longitud variable de 0.5 – 0.8 μm , Gram positivos, obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares produciendo ácido láctico como producto principal o único de su metabolismo, son catalasa-negativas, no formadoras de esporas, anaerobio tolerantes, y de altos requerimientos nutritivos, son quimiorganotróficos y solamente crecen en medios complejos. Además de los requerimientos nutricionales, la temperatura es uno de los factores más importantes que influyen en el crecimiento de estas bacterias.

De acuerdo a (Balciunas et al., 2013) dentro de los principales géneros se encuentran *Lactococcus*, *Oenococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus* y *Streptococcus* sp. Conforme a su capacidad metabólica pueden clasificarse en homofermentativas o heterofermentativas. En el primer caso, dos moléculas de lactato son generadas (Figura 1. A) y como representantes están los géneros *Streptococcus* y *Lactococcus*; en el segundo caso, lactato, etanol y CO_2 son producidos (Figura 1. B) teniendo a *Leuconostoc* y a algunos *Lactobacillus* como principales representantes (Parada, Caron, Medeiros, & Soccol, 2007).

Desde tiempos remotos y empíricamente las BAL han sido empleadas en la elaboración y conservación de alimentos, constituyendo una parte fundamental como cultivos iniciadores de diversos alimentos (i.e. productos de panificación, carnes fermentadas, bebidas alcohólicas, vegetales en conserva, productos lácteos, etc.), proporcionando propiedades sensoriales y nutricionales a los alimentos además de contribuir a retardar su deterioro. Por esta razón las BAL son consideradas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) por la FDA (*Food and Drug Administration*) (Balciunas et al., 2013; Chen & Hoover, 2003; Parada et al., 2007).

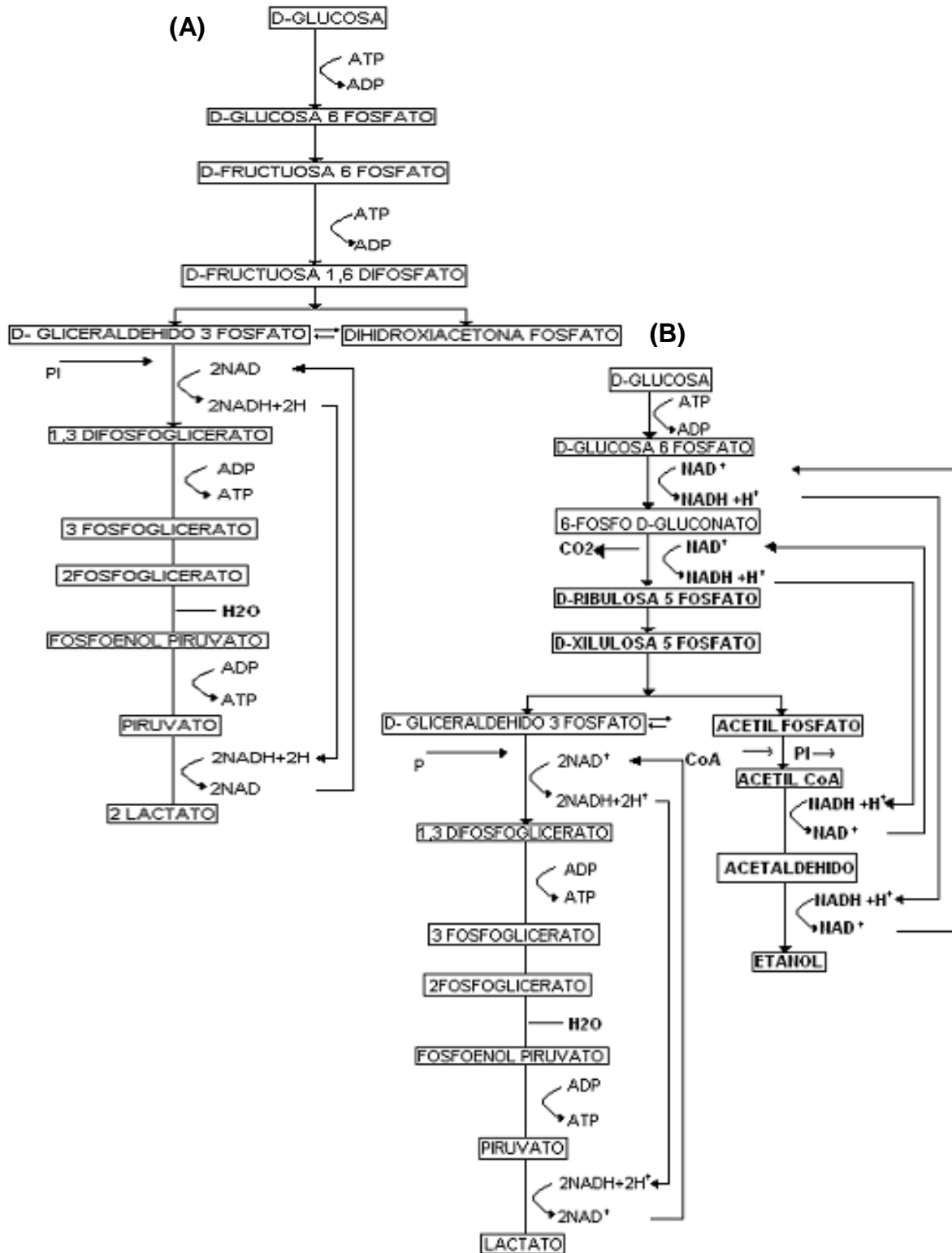


Figura 1. Principales rutas metabólicas de las BAL: (A) Fermentación homoláctica; (B) Fermentación heteroláctica (De Vuyst, Callewaert, & Crabbé, 1996).

2.1.1 Metabolitos antimicrobianos de las BAL

Una de las principales características reconocidas y deseables de las BAL, es la capacidad de producir compuestos con actividad antimicrobiana, los cuales brindan protección a los alimentos contra microorganismos patógenos (Savadogo, Ouattara, Bassole, & Traore, 2006).

El uso de microorganismos no patogénicos y/o sus metabolitos para mejorar la seguridad microbiológica y extender la vida de anaquel de alimentos es definida como bioconservación (Parada et al., 2007). Dicho campo ha sido de interés en los últimos años haciendo énfasis en el estudio de las BAL, cuyos productos con actividad antimicrobiana ofrecen aplicaciones potenciales en la industria de alimentos, ayudando a disminuir la adición de conservadores químicos así como la intensidad de tratamientos térmicos que pueden alterar las propiedades físicas y sensoriales de los alimentos (Galvez, Abriouel, Lopez, & Ben Omar, 2007).

De acuerdo con Parente and Ricciardi (1999) los principales mecanismo de actividad inhibitoria de las BAL son debidos a la competencia por nutrientes y la producción de compuestos derivados del metabolismo de las BAL, principalmente ácidos orgánicos como ácido láctico y ácido acético, los cuales causan disminución del pH; peróxido de hidrogeno (H_2O_2) cuyo efecto antimicrobiano está basado en sus propiedades oxidativas que resulta en cambios irreversibles en la membrana celular; además de otros compuestos antimicrobianos como etanol, CO_2 , diacetilo, diacetaldehído, ácidos grasos, reuterina y bacteriocinas (De Vuyst & Leroy, 2007; Martínez-Fernández, 1996; Vandenberg, 1993).

Dentro de los metabolitos de las BAL con propiedades antimicrobianas interesantes que han recibido mayor atención en los últimos años, se encuentran las bacteriocinas, de las cuales se detallaran aspectos en el apartado siguiente.

2.2 Bacteriocinas

De acuerdo con (Balciunas et al., 2013) las primeras bacteriocinas descritas, fueron las colicinas en 1925, producidas por la bacteria Gram negativa, *Escherichia coli*, y posteriormente, se realizaron estudios en bacterias Gram positivas, especialmente en cepas de *Lactococcus lactis*, siendo la nisina la primera bacteriocina con aplicación comercial desde 1969.

En forma general las bacteriocinas son definidas como péptidos producidos por bacterias que inhiben o matan a otros microorganismos (Balciunas et al., 2013). Por su parte De Vuyst and Leroy (2007) definen a las bacteriocinas de BAL como pequeños péptidos antimicrobianos, sintetizados en ribosomas que poseen actividad contra bacterias Gram positivas cercanamente relacionadas. Estos péptidos antimicrobianos usualmente tienen bajo peso molecular, en general son moléculas catiónicas y anfipáticas, en algunos casos son sometidas a modificaciones postraduccionales y pueden ser fácilmente degradadas por enzimas proteolíticas, especialmente por proteasas del tracto gastrointestinal de mamíferos lo cual las hace seguras para el consumo humano (Kaur, Singh, & Malik, 2013; Zacharof & Lovitt, 2012). Los problemas de resistencia de bacterias a antibióticos y un incremento en la demanda de alimentos seguros y con menos aditivos, han generado un interés en la investigación para la aplicación o remplazo de conservadores químicos por las bacteriocinas de BAL en la industria alimentaria (Parada et al., 2007). Por tal motivo las investigaciones en este campo se han desarrollado cada vez más, resultando en el descubrimiento y caracterización de un gran número de bacteriocinas de BAL en las últimas décadas.

Las bacteriocinas producidas por BAL ofrecen varias propiedades deseables que las hacen adecuadas para la conservación de alimentos (Galvez et al., 2007), como son las siguientes:

1. Son reconocidas generalmente como sustancias seguras (GRAS).
2. No son activas ni tóxicas en células eucariotas.
3. Se inactivan en el tracto digestivo por medio de proteasas por lo que tienen poca influencia sobre la microflora intestinal.
4. Por lo general son resistentes a un amplio rango de pH y temperaturas,
5. Tienen un relativo amplio espectro antimicrobiano contra muchos patógenos de origen alimentario y bacterias responsables de descomposición.
6. Muestran un modo de acción bactericida, que actúa sobre la membrana citoplasmática bacteriana sin causar resistencia como algunos antibióticos.
7. Sus determinantes genéticos generalmente tienen que ver con elementos movilizables como cromosomas asociados a transposones y plásmidos, lo que facilita su manipulación genética (Deegan, Cotter, Hill, & Ross, 2006).

2.2.1 Clasificación

La mayoría de las bacteriocinas de BAL son moléculas catiónicas, hidrofóbicas, o anfifílicas, compuestas de 20 a 60 residuos de aminoácidos. Diversos autores (Balciunas et al., 2013; Benmechernene et al., 2013; Cleveland, Montville, Nes, & Chikindas, 2001; Papagianni, 2003; Ross, Morgan, & Hill, 2002) comúnmente clasifican a las bacteriocinas en 4 clases (Cuadro 1) que a continuación se detallarán.

2.2.1.1 Clase I o Lantibióticos

Son pequeños péptidos (<5 kDa), tienen de 19 a 38 residuos de aminoácidos en su estructura. Contienen aminoácidos termoestables inusuales, los cuales resultan de la combinación de dos alaninas unidas por un enlace disulfuro, como lantionina (Lan), o de ácido amino butírico vinculado a una alanina por un enlace disulfuro para β -metil-lantionina (MeLan) (Chen & Hoover, 2003).

El principal representante de esta clase es la nisina, que se produce por algunas cepas de *Lactococcus lactis* subs. *lactis* y se compone de 34 residuos de aminoácidos. Dos variantes de la nisina son conocidas, nisina A y nisina Z, que difieren estructuralmente en sólo un aminoácido.

En este tipo de bacteriocinas se distinguen dos tipos, A y B, de acuerdo a su estructura química y a su actividad antimicrobiana.

Tipo A

Péptidos elongados con una carga neta positiva y que ejercen su actividad a través de la formación de poros en las membranas bacterianas.

Tipo B

Son péptidos pequeños globulares y tienen carga neta negativa o bien no tienen carga, su actividad antimicrobiana está relacionada a la inhibición de enzimas específicas.

2.2.1.2 Clase II o No lantibióticos

Esta clase está representada por péptidos pequeños (<10 kDa), termoestables, que a diferencia de los de la clase I éstos no contienen aminoácidos inusuales en su estructura. Es el grupo más grande de bacteriocinas en el sistema de clasificación y está dividido en tres subgrupos:

Clase IIa

Esta clase ha llamado la atención por su particular especificidad contra *Listeria monocytogenes*. Tienen de 37 a 48 residuos de aminoácidos y sus secuencias demuestran un elevado grado de homología (40 - 70%), los péptidos de este subgrupo generalmente comparten la presencia de una secuencia altamente conservada Tyr–Gly–Asn–Gly–Val y dos cisteínas que forman un enlace disulfuro en el extremo N-terminal (Cleveland et al., 2001; Héchard & Sahl, 2002) y en el

otro extremo, C-terminal poseen aminoácidos hidrofóbicos que interaccionan con la membrana de las células diana originando los poros de inhibición.

Clase IIb

Este tipo de bacteriocinas requiere la acción combinada de dos péptidos para ser una molécula biológicamente activa, ya que cada péptido no muestra actividad inhibitoria individual (Chen & Hoover, 2003).

Clase IIc

Las bacteriocinas de la subclase IIc poseen en común una estructura cíclica como resultado de la unión covalente entre los extremos amino-terminal y C-terminal.

2.2.1.3 Clase III

Este grupo no ha sido bien caracterizado, sin embargo se sabe que son moléculas grandes (>30 kDa), termolábiles a temperaturas mayores de 60 °C. Esta clase ha sido poco estudiada, presentando un bajo interés en los investigadores dada su termolabilidad y escasa aplicación en la industria alimentaria.

2.2.1.4 Clase IV

Este grupo incluye bacteriocinas que forman complejos con otros compuestos químicos, como carbohidratos o lípidos, necesarios para la actividad antimicrobiana. En la actualidad, no hay bacteriocinas de este tipo que se hayan sido purificadas.

Cuadro 1. Clasificación de bacteriocinas y microorganismos productores.

Clase	Bacteriocina	Productor	Descripción
Clase I Tipo A Lantibióticos	Nisina A y Z	<i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>lactis</i>	
	Lactocina S	<i>Lactobacillus sakei</i>	
	Epidermina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Contienen algunos aminoácidos poco comunes como la
	Gallidermina	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	
Clase I Tipo B Lantibióticos	Lacticina 481	<i>Lactococcus lactis</i>	lantionina, α -metil
	Mersacidina	<i>Bacillus subtilis</i>	lantionina y
	Cinamicina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	deshidroalanina
	Ancovenina	<i>Streptomyces</i> ssp.	
	Duramicina	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	
Clase IIa	Actagardina	<i>Actinoplanes</i> ssp.	
	Pediocina PA-1/AcH	<i>Pediococcus acidilacti</i>	
	Pediocina JD	<i>Pediococcus acidilacti</i> JD1-23	
	Sakacina A	<i>Lactobacillus sakei</i> 706	
	Sakacina P	<i>Lactobacillus sakei</i> LTH673	< 10 kDa, estables al calor, no contienen lantionina
	Leucocin A-UAL 187	<i>Leuconostoc gelidum</i>	
	Mesentericina Y 105	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	
	Enterocina A	<i>Enterococcus faecium</i>	
	Divercina V41	<i>Carnobacterium divergens</i>	
Lactococina MMFII	<i>Lactococcus lactis</i>		
Clase IIb	Curvacina A	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH1174	
	Lactococina A	<i>Lactococcus cremoris</i>	
	Lactococina B	<i>Lactococcus cremoris</i> 9B4	
	Lactococina G	<i>Lactococcus lactis</i>	
	Lactococina M	<i>Lactococcus lactis</i>	Requieren dos diferentes péptidos para su actividad
	Lactacina F	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	
	Plantaricina A	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Plantaricina S	<i>Lactobacillus plantarum</i>	
	Plantaricina EF	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11	
Plantaricina JK	<i>Lactobacillus plantarum</i>		
Clase IIc	Acidocina B	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Péptidos
	Carnobacteriocina A	<i>Carnobacterium piscicola</i>	termoestables y se transportan por péptidos líder
	Divergicina A	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13	
	Enterocina P	<i>Enterococcus faecium</i>	

	Enterocina B	<i>Enterococcus faecium</i>	
Clase III	Helveticina J	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Péptidos > 30 kDa,
	Helveticina V- 1829	<i>Lactobacillus helveticus</i>	termolábiles

Fuente: (Alquicira-López, 2006; Chen & Hoover, 2003).

2.2.2 Modo de Acción

Los péptidos antimicrobianos son generalmente eficaces contra microorganismos Gram positivos. Las bacteriocinas de las BAL pueden ser ineficaces para inhibir organismos Gram negativos debido a que la membrana externa de éstos protege el sitio de acción para la bacteriocina, el cual es generalmente la membrana celular (Cleveland et al., 2001; Oscariz & Pisabarro, 2001).

Las bacteriocinas son moléculas cargadas positivamente con regiones hidrofóbicas, por lo tanto los lípidos aniónicos de la membrana citoplasmática son los principales receptores de bacteriocinas de BAL. El primer paso consiste en la interacción electrostática entre las bacteriocinas y la membrana citoplasmática para el inicio de la formación de poros (Alquicira-López, 2006; Chen & Hoover, 2003). El segundo paso consiste en la adhesión de estos péptidos de forma paralela sobre la superficie de la membrana y cuando la razón péptido/lípido aumenta los péptidos se orientan de forma perpendicular, este reordenamiento provoca la inserción de estos péptidos en la membrana y por consiguiente su permeabilización, culminando con la formación de poros transmembranales (Oscariz & Pisabarro, 2001; Yann & Hans-Georg, 2001).

De acuerdo con Yann and Hans-Georg (2001) la formación de poros conlleva a la disipación del potencial de membrana y promueve la pérdida de pequeños metabolitos como aminoácidos y ATP ocasionando a su vez que se detengan los procesos de biosíntesis indispensables para la célula. Por su parte, Parada et al. (2007) mencionan que las principales consecuencias son la pérdida de iones como K y Mg, pérdida de la fuerza protón motriz y la salida de ATP y aminoácidos. La fuerza protón motriz tiene un papel fundamental en la síntesis de ATP,

transporte activo y movimiento bacteriano, por lo tanto si la síntesis de macromoléculas así como la síntesis de energía se inhibe, el resultado será la muerte celular.

Brogden (2005) propone diferentes mecanismos de acción que se representan en diversos modelos (Figura 2), los cuales se describen a continuación.

Modelo en barril: También conocido como modelo de haces de hélices transmembrana (*Transmembrane helical-hundle model*), los péptidos helicoidales orientados en paralelo, se insertan perpendicularmente en la membrana de modo que las regiones hidrofóbicas de los péptidos se alinean con la región central de los lípidos de la membrana, dejando a las regiones hidrofílicas hacia el exterior, se forma así un poro transmembranal muy similar a un barril sin fondo cuyas paredes están constituidas por la parte hidrofílica de los péptidos helicoidales.

Modelo de carpeta: Los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa cubriendo la superficie de la membrana celular como una carpeta. En altas concentraciones estos péptidos interrumpen la continuidad de la membrana insertándose en la membrana en paralelo a la bicapa lipídica, mediante sus regiones hidrofóbicas. Las regiones polares de los péptidos quedan expuestas al exterior, de modo que actúan de manera similar a los detergentes.

Modelo de poro toroidal: Los péptidos se acumulan en la superficie de la membrana celular y se insertan en la membrana induciendo la distorsión de la monocapa de lípidos por lo que ésta se curva a través del poro, de modo que las regiones polares de ambas capas llegan a unirse. Así, las paredes del poro quedan formadas por las cabezas polares de los lípidos de membrana y por los péptidos insertados en ella.

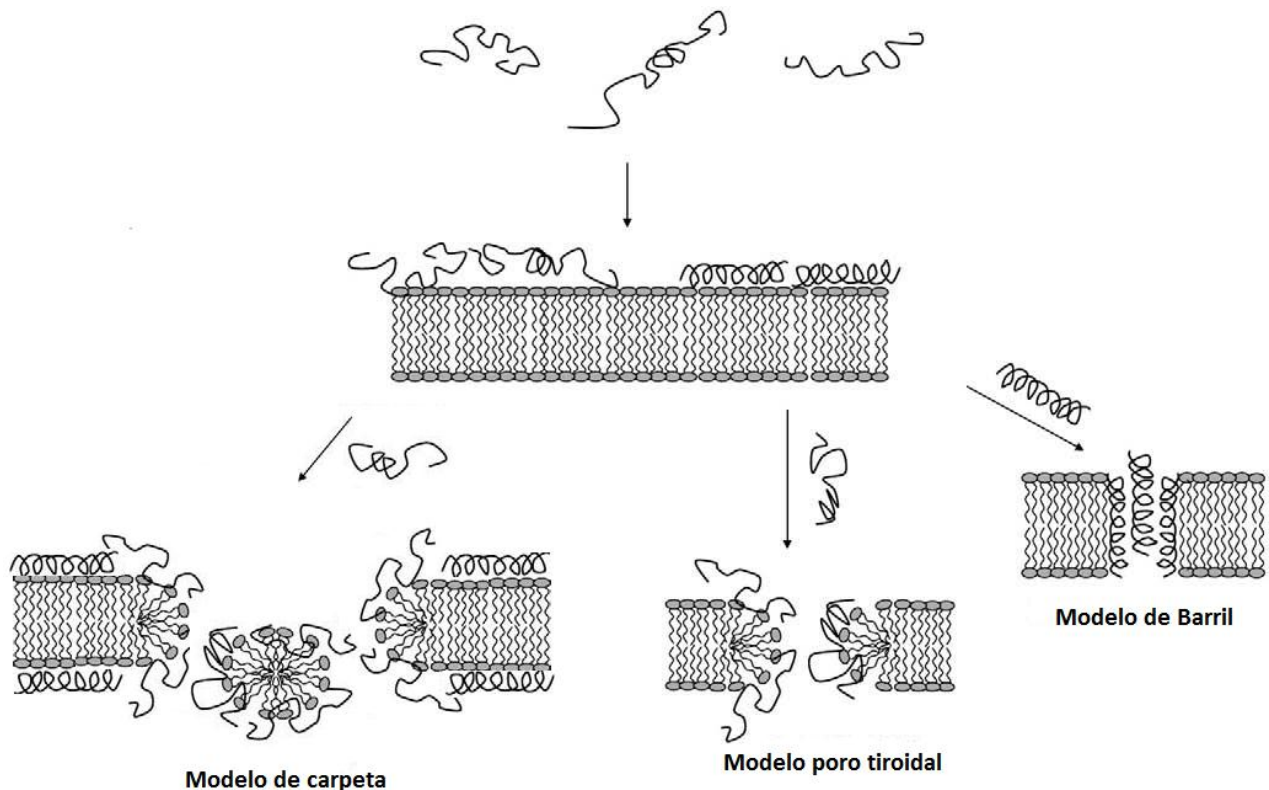


Figura 2. Esquema de diferentes mecanismos de acción propuestos para los péptidos antimicrobianos. Modificado de Strömstedt, Ringstad, Schmidtchen, and Malmsten (2010).

2.2.3 Biosíntesis

Las bacteriocinas son péptidos sintetizados en ribosomas. Los genes que codifican la producción de las bacteriocinas y la inmunidad en las mismas están usualmente organizados en grupos de operones localizados en el cromosoma como el caso de la mersacidina, en plásmidos como la divergicina o en transposones como la nisina (Cleveland et al., 2001; Chen & Hoover, 2003; Parada et al., 2007).

La mayoría de las bacteriocinas son sintetizadas como pre-péptidos biológicamente inactivos (Chen & Hoover, 2003), que posteriormente son modificados para formar moléculas maduras biológicamente activas. Funciones auxiliares específicas para la producción de bacteriocinas incluyen mecanismos

para la translocación extracelular, autoinmunidad a la actividad bactericida de la molécula y transporte, por tal motivo la mayoría de los operones de las bacteriocina incluyen: (i) un gen estructural que codifica la pre-bacteriocina; (ii) el gen que codifica la proteína de la inmunidad; (iii) los genes responsables de la elaboración y el transporte de la bacteriocina, y, en algunos casos, (iv) la los genes que codifican las enzimas implicadas en modificaciones postraduccionales (Parada et al., 2007).

Mientras todas las clases de bacteriocinas son sintetizadas en ribosomas, solo las que pertenecen a la Clase I requieren modificaciones postraduccionales para producir su forma activa (Cleveland et al., 2001; Parente & Ricciardi, 1999).

2.2.4 Bacteriocinas vs. antibióticos

Aunque las bacteriocinas podrían ser categorizadas como antibióticos, no lo son. La principal diferencia entre bacteriocinas y antibióticos (Cuadro 2) es que las bacteriocinas restringen su actividad a cepas de especies taxonómicamente relacionadas y particularmente a las cepas de la misma especie. Los antibióticos, por otro lado, tienen una mayor espectro de actividad, incluso si su actividad se limita no mostrando ningún efecto preferencial sobre cepas estrechamente relacionadas (Cleveland et al., 2001; Zacharof & Lovitt, 2012).

Cuadro 2. Principales diferencias entre bacteriocinas y antibióticos.

Características	Bacteriocina	Antibiótico
Aplicación	Alimentación	Clínica
Síntesis	Ribosómica	Metabolitos secundarios
Actividad	Espectro reducido	Amplio espectro
Inmunidad del productor	Si	No
Mecanismo de resistencia	Adaptación relacionada con la composición de membrana	Modificación genética
Modo de acción	Principalmente, formación de poros	Dianas intra o extracelulares
Toxicidad	No descritos	Si

Fuente: (Chen & Hoover, 2003)

2.2.5 Aplicación de las bacteriocinas en la industria alimentaria

La necesidad de ofrecer alimentos “frescos” mínimamente procesados y el creciente rechazo del consumidor actual hacia los aditivos químicos han llevado a la industria alimentaria a reconsiderar el potencial antimicrobiano de las bacterias lácticas como una nueva estrategia de conservación.

De todas las sustancias antimicrobianas producidas por las bacterias lácticas, las bacteriocinas aparecen como las más adecuadas desde un punto de vista tecnológico para ser utilizadas como conservantes de grado alimentario (De Vuyst & Vandamme, 1992). En principio, su naturaleza peptídica permite la degradación por las enzimas digestivas, resultando así presuntivamente inocuas para el consumidor y su microbiota intestinal y, en algunos casos, su espectro de acción incluye a los potenciales patógenos y alterantes asociados a los alimentos (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium* spp., etc.). Por último, sus propiedades fisicoquímicas las hacen resistentes a los tratamientos térmicos y cambios de pH que sufren los alimentos durante su fabricación y almacenamiento y, además, su pequeño tamaño permite la difusión en sistemas semisólidos, propios de la mayoría de los productos alimentarios (Galvez et al., 2007).

La posibilidad de utilizar cepas productoras de nisina para conservar los alimentos fue sugerida por Hirsch (1951). Este autor consiguió evitar la hinchazón tardía de los quesos (debida a la producción de gas por *Clostridium* spp.) e inhibir el crecimiento de *S. aureus*. A partir de este momento y hasta la fecha actual, la utilización de la nisina ha aumentado exponencialmente. Se aplica con éxito en distintos productos y sistemas alimentarios, con especial referencia a la inhibición de *L. monocytogenes* (De Arauz, Jozala, Mazzola, & Vessoni Penna, 2009). La nisina también se utiliza para disminuir la intensidad del tratamiento térmico de los alimentos, para controlar la fermentación maloláctica en vinos y para evitar el crecimiento de bacterias lácticas durante la fabricación de la cerveza (Cleveland et al., 2001).

En la actualidad la nisina es la única bacteriocina legalmente autorizada como conservante en aproximadamente 50 países. El Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la organización conjunta FAO/WHO (Food and Agriculture Organization /World Health Organization) determinó que la nisina es segura para uso alimentario en 1969, aprobándose su uso en quesos procesados hasta una concentración máxima de 12.5 mg/kg de producto final. Este bioconservante también se añadió a la lista de aditivos alimentarios de Unión Europea donde se le asignó el número E234 (CEE, 1983) (Ross et al., 2002).

El uso de la nisina en productos cárnicos ha sido menos efectivo. No obstante, otras bacteriocinas (pediocinas) se presentan como buenas candidatas en estos sistemas (Papagianni & Anastasiadou, 2009). Teniendo en cuenta que existe el precedente de la nisina, aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) como conservante alimentario, posiblemente se simplificarán los trámites legales necesarios para la aprobación de las pediocinas como aditivos alimentarios.

De acuerdo con Deegan et al. (2006) y Galvez et al. (2007), las bacteriocinas pueden ser aplicadas en los alimentos en al menos dos formas, ya sea aplicando una preparación purificada o semipurificada como un ingrediente en los alimentos (*ex situ*) o bien mediante la incorporación de la cepa productora de bacteriocinas como reemplazo o parte de los cultivos iniciadores en alimentos fermentados (*in situ*) (Figura 3).



Figura 3. Alternativas para la incorporación de bacteriocinas en los alimentos (Deegan et al., 2006).

2.2.5.1 Aplicación *Ex Situ*

Preparaciones de bacteriocinas pueden ser obtenidas mediante el cultivo de la cepa productora en un medio de crecimiento adecuado, seguido por la inactivación de la bacteria por calor y posteriormente una concentración del caldo por liofilización o secado por aspersion. Ejemplo de algunas preparaciones comerciales son Nisaplin, Alta 2341 o Microgard (Cuadro 3). Otros bacteriocinas tales como lacticina 3147, variacina de *Kokuria varians* o enterocina AS-48 también se han obtenido como preparaciones en polvo, sin embargo Nisaplin de Danisco representa la forma de nisina comercialmente más utilizada como conservador en los alimentos. Este producto tiene un 2.5% de nisina como ingrediente activo, 77.5% de NaCl, y leche en polvo sin grasa que comprende el 12% de proteína y 6% de carbohidratos (Jones, Salin, & Williams, 2005).

Cuadro 3. Aplicaciones Industriales de bacteriocinas producidas por compañías internacionales.

Nombre comercial	Compañía	País	Bacteriocina / Productor	Bacterias sensibles	Aplicación
Nisaplin	Danisco	Dinamarca	Nisina A / <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria</i> spp. <i>Bacillus</i> spp. <i>Clostridium</i> spp.	Lácteos Panificación Bebidas Delicatessen
Alta 2341	Kerry	Irlanda	Pediocina PA-1 / <i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	Cárnicos
Nisin A y Nisin Z	Handary	Holanda	Nisina A, Nisina Z / <i>Lactococcus lactis</i>	<i>Listeria</i> spp. <i>Clostridium</i> spp <i>B. cereus</i> Otras Gram +	Lácteos Panificación Bebidas Cárnicos Salsas y aderezos Cultivos iniciadores
SafePro	Chr. Hansen	Dinamarca	Pediocina Sakacina A	<i>Listeria monocytogenes</i>	para embutidos
Microgard 430	Danisco	Dinamarca	<i>Propionibacterium freudenreichii</i> / Propionicina F	Diversas bacterias patógenas	Cultivo protector para queso cottage y yogurt

Modificado de Benmechernene et al. (2013)

2.2.5.2 Aplicación *In Situ*

Cepas productoras de bacteriocina pueden ser aplicadas como cultivos iniciadores en alimentos fermentados siempre que éstas presenten las propiedades tecnológicas adecuadas, o como un cultivo adjunto en combinación con cepas iniciadoras bacteriocina-resistentes. También se pueden aplicar como cultivos bioprotectores en los alimentos no fermentados, a condición de que no generen efectos adversos en los alimentos (Cuadro 4).

Cuadro 4. Aplicación de cultivos productores de bacteriocinas en alimentos.

Cepa / Bacteriocina	Aplicación	Referencia
<i>Lactococcus lactis</i> IFPL 3593 / Lacticina 3147	Inhibición de formación de gas por <i>C. tyrobutyricum</i> y lactobacilos heterofermentativos en queso.	(Martínez-Cuesta et al., 2010)
<i>Lactobacillus curvatus</i> / Curvacina	Efecto antilisterial en carne fermentada. Reducción de células viables de	(Dicks, Mellett, & Hoffman, 2004)
<i>Enterococcus faecalis</i> CECT7121 / Enterocina MR99	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>S. aureus</i> y otros cocos Gram Positivos en embutidos fermentados secos.	(Sparo et al., 2008)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Disminución de supervivencia de <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> O157:H7 y <i>S. enterica</i> en papilla de harina de mijo malteada.	(Sánchez-Valenzuela et al., 2008)
<i>Enterococcus faecalis</i> / Enterocina AS-48	Reducción de células viables de <i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> y <i>S. aureus</i> en jugo de lechuga.	(Grande et al., 2005)

2.2.6 Purificación de bacteriocinas

Debido a que las bacteriocinas son activas contra diversos patógenos causantes de enfermedades en humanos y transmitidos por alimentos, además de ser consideradas GRAS por la FDA y de fácil degradación por proteasas del tracto digestivo, son en definitiva una opción viable para aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, antes de que una bacteriocina pueda ser considerada como alternativa tecnológica es necesario purificarla, disponiendo de un péptido puro y homogéneo. Además, es necesario llevar a cabo la caracterización, elucidación de estructura bioquímica y modo de acción de estos péptidos antimicrobianos (Vera Pingitore, Salvucci, Sesma, & Nader-Macías, 2007). Sin embargo los procesos de purificación de bacteriocinas, en especial las producidas por BAL, representan una tarea complicada. Algunos de los principales problemas exhibidos durante estos procesos son el hecho

que las BAL representan microorganismos exigentes dando la necesidad de emplear medios complejos ricos en nutrientes para su crecimiento (i.e., caldo MRS, caldo M17, caldo Soya Trypticaseina, etc.) a menudo estos medios contienen péptidos pequeños (3,000 – 6,000 Da) en el rango de la mayoría de las bacteriocinas, además de que las concentraciones en las que se encuentran son considerablemente mayores ($10 - 30 \text{ g L}^{-1}$) en comparación con las de las bacteriocinas ($10 - 100 \text{ mg L}^{-1}$) (Parente & Ricciardi, 1999). Por otro lado estas moléculas muestran una tendencia a asociarse con otras debido a su hidrofobicidad, complicando así su separación.

Puesto que las bacteriocinas corresponden a un grupo ampliamente heterogéneo, un método o protocolo general de purificación no es viable, sino que se requiere de protocolos específicos que necesitan generalmente ser diseñados para cada bacteriocina. Un amplio número de metodologías para la purificación han sido descritas en la literatura, como se muestra en el Cuadro 5, sin embargo Saavedra and Sesma (2011) mencionan una estrategia clásica que ha sido empleada por diversos autores, esta estrategia sigue etapas como: (a) concentración del péptido en el sobrenadante de cultivo por precipitación con sales o extracción ácida, (b) cromatografía de intercambio iónico, (c) interacción hidrofóbica, (d) filtración en gel y/o de fase reversa (RP-HPLC).

Otro método alternativo que promete altos rendimientos es el descrito por Yang, Johnson, and Ray (1992), dicho método consiste en la adsorción de la bacteriocina en la bacteria productora a pH 5 - 7, y posteriormente una desorción a un pH más bajo (pH 1.5 - 2), bacteriocinas como pediocina AcH, nisina, sakacina A y leuconocina Lcm1 fueron purificadas con este método.

Cuadro 5. Estrategias de purificación de algunas bacteriocinas de BAL.

Bacteriocina	Productor	Purificación	Rendimiento	Características	Referencia
Termofilina 81	<i>Streptococcus thermophilus</i> 81	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , saturación 80%, extracción con butanol, cromatografía de filtración en gel con columna TSK 2000 SW y doble HPLC con columna Eurosil Bioselect 300 C (8 x 250 mm).	5.4%	Péptido de 32 aminoácidos, PM 4,500 Da, activa contra bacterias Gram negativas.	(Ivanova et al., 1998)
Pediocina ACCEL	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ACCL	Adsorción- desorción celular y FPLC con columna Superose 12.	15%	PM 17.5 kDA, compuesta por 19 residuos de aminoácidos similares a los de Pediocina PA-1/AcH, por lo que podría pertenecer a la clase IIa.	(Wu, Yin, & Jiang, 2004)
Piscicocina CS526	<i>Carnobacterium piscicola</i> CS526	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , saturación 50%, cromatografía filtración en gel con Sephadex G-50, cromatografía de intercambio catiónico SP-Sepharose Fast Flow, filtración con cartuchos Sep-Pack C ₁₈ y RP-HPLC con columna C18 ODS-80Ts (4.6 x 150 mm)	7%	PM 4,430 Da, capacidad antilisterial y posible bacteriocina clase IIa.	(Yamazaki, Suzuki, Kawai, Inoue, & Montville, 2005)
Enterocina EJ97	<i>Enterococcus faecalis</i> EJ97	Cromatografía de intercambio catiónico con Carboxymetil-Sephadex CM25 y RP- HPLC con columna Vydac 218TP510 (10 x 250 mm).	48.85%	PM 5,340 Da, estable a condiciones leves de calor y sensible a enzimas proteolíticas.	(Lucas-López et al., 2007)

Lacticina Q	<i>Lactococcus lactis</i> QU 5	Precipitación con acetona (3 volúmenes), cromatografía de intercambio catiónico con columna SP Sepharose Fast Flow y RP-HPLC con columna RESOURCE RPC.	60%	PM 5,926.50 Da, compuesta por 53 residuos de aminoácidos, altamente catiónica, rica en triptófano, posible bacteriocina clase II.	(Fujita et al., 2007)
Enterocina S37	<i>Enterococcus faecalis</i> S37	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , saturación 80%, seguida de 2 etapas de RP-HPLC; primero con columna ATOLL 15 MP3 (10 × 250 mm) y posteriormente con columna C18 Symmetry 300 (4.6 × 150 mm).	32%	PM entre 4 y 6 kDa, actividad antilisteria, altamente hidrofóbica y posible bacteriocina clase IIa.	(Belguesmia et al., 2010)
Salivaricina SMXD51	<i>Lactobacillus salivarius</i> SMXD51	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , saturación 80%, elución en cartucho de fase reversa SPE UPTI-CLEAN usando diferentes concentraciones de acetonitrilo (32, 48 y 80 %), RP-HPLC con columna C18 Symmetry 300 (2.1 × 150 mm).	8%	PM 5,382 Da, activa contra <i>Campylobacter jejuni</i> y otras Gram-negativas.	(Messaoudi et al., 2012)
Thuricina Bn1	<i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> Bn1	Precipitación con (NH ₄) ₂ SO ₄ , saturación 80%, diálisis con membrana Spectra-Por no. 3 (corte 5,000 Da), cromatografía de filtración en gel con Sephadex G-50 y HPLC con columna Agilent Zorbax 300 SB-C18.	0.53%	PM 3,139.40 Da, termolábil a 70 °C/90 min, activa contra Gram-negativas, Gram-positivas.	(Ugras, 2013)

Plantaricina ZJ008	<i>Lactobacillus plantarum</i> ZJ008	Columna de resina macroporosa XAD-2 (2.5 × 30 cm), cromatografía de intercambio catiónico con columna HiPrep Q HP 16/10, cromatografía filtración en gel con columna Superdex Peptide 10/300 GL y RP-HPLC con columna Lichrospher C18 (2.1 × 150 mm).	1.98%	PM 1,334.77 Da, altamente termoestable (121 °C/30 min), sensible a proteasas. Amplio espectro contra Gram-positivas y Gram-negativas, especialmente <i>Staphylococcus</i> spp.	(Zhu, Zhao, Sun, & Gu, 2014)
Bacteriocina F1	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> FX-6	Cromatografía RP-HPLC en 3 etapas con columnas C18 Macherey Nagel (20 × 450 mm), Shim-pack PRC-ODS (K) (30 × 250 mm) y RP ECOSIL C18 (4.6 × 250 mm) respectivamente.	---	PM 2,113.84 Da, altamente termoestable (120 °C/20 min), amplio espectro de inhibición, activa contra Gram-negativas, Gram-positivas y algunos hongos.	(Miao et al., 2014)

2.3 Producción de bacteriocinas en medios complejos alternos

De acuerdo con Trinetta et al. (2008) la producción de bacteriocinas por BAL ha demostrado estar relacionada con el crecimiento celular, presentando una máxima actividad proporcional a la etapa de máximo crecimiento celular (al término de la fase exponencial). Sin embargo, varios factores pueden influir en el nivel de producción de bacteriocinas, siendo los requerimientos nutricionales uno de los principales.

El crecimiento de las BAL está estrechamente ligado a medios ricos en nutrientes, como leche, carne, bebidas, granos y vegetales, siendo muy exigentes en cuanto a su nutrición. A pesar de la utilidad que tienen las BAL para la industria de los alimentos, es reconocida la dificultad que representa cultivarlas por la necesidad de medios ricos en nutrientes (i.e., carbohidratos, ácidos nucleicos, minerales, vitaminas y proteínas o aminoácidos; (Arauz et al., 2011)), esto trae como consecuencia que los medios de cultivo para su producción sean costosos haciéndose inaccesibles en producciones a gran escala, sin embargo estos costos pueden ser reducidos si son empleados como medios de cultivo alternos residuos y subproductos de la industria alimentaria como suero de leche, hidrolizados de vísceras de pescado, desechos del procesamiento de mejillones, melazas, etc. (Trinetta et al., 2008; Wolf-Hall, Gibbons, & Bauer, 2009). Por lo tanto, diversas alternativas de valorización de estos residuos con la producción simultánea de compuestos como bacteriocinas de alto valor añadido, es de notable importancia dentro de la industria de alimentos.

2.3.1 Melaza

De acuerdo a la asociación gubernamental Financiera Rural (2011) (<http://www.financierarural.gob.mx>) la melaza es un producto líquido espeso derivado de la caña de azúcar. Se elabora mediante la cocción del jugo de la caña de azúcar hasta la evaporación parcial del agua que éste contiene, formándose un producto meloso semi-cristalizado. Su aspecto es similar al de la miel de abeja

aunque de color parduzco muy oscuro, prácticamente negro, de sabor dulce y agradable. Representa uno de los subproductos más importantes de la industria azucarera teniendo como usos principales la producción de etanol, alimento de ganado y sustrato para fermentaciones (Metsoviti et al., 2011; Wee et al., 2004).

En investigaciones similares Dumbrepatil et al. (2007) mencionan que la melaza tiene un contenido de azúcares (sacarosa) de 40 a 60%, debido a la presencia de estos azúcares fermentables en concentraciones significantes, la melaza representa una fuente importante de carbohidratos necesarios para el metabolismo de las BAL, además de otros nutrientes en menor proporción (Cuadro 6), lo que la convierte en un sustrato alternativo para soportar su crecimiento.

Cuadro 6. Composición de la melaza.

Componentes	Constituyentes	Contenido
Componentes mayores	Materia seca	78%
	Proteínas	3%
	Sacarosa	60-63% p/p
	Azúcares reductores	3-5% p/p
	Sustancias disueltas (diferentes azúcares)	4-8% p/p
	Agua	16%
	Grasas	0.40%
	Cenizas	9%
Contenido de minerales	Calcio	0.74%
	Magnesio	0.35%
	Fósforo	0.08%
	Potasio	3.67%

	Glicina	0.10%
	Leucina	0.01%
Contenido de aminoácidos	Lisina	0.001%
	Treonina	0.06%
	Valina	0.02%

Fuente: (Fajardo-Castillo & Sarmiento-Forero, 2007)

En el mercado internacional, la melaza de caña tiene diferentes destinos básicos: alimento animal, producción de alcohol, reprocesamiento industrial para extraer el azúcar contenido en ella y como sustrato para la producción de levadura, ácido cítrico y lisina, entre otros. Sin embargo el uso de la melaza ha sido poco aprovechado como base para medios complejos para la producción de bacteriocinas; dentro de los autores que han explorado el uso de melaza para este fin, se encuentran Metsoviti et al. (2011) quienes reportan una actividad antimicrobiana de ~320 UA/mL cuando se tuvo una concentración inicial de melaza de 30 g/L_{medio de cultivo}.

En México, durante el 2010 según FinancieraRural (2011) se tuvo una producción de melaza de 1.5 millones de toneladas, siendo los principales estados productores Veracruz, Jalisco, San Luis Potosí, Chiapas y Nayarit abarcando el 68.7% de la producción nacional. El precio de venta ronda \$2.50 M.N. por kilogramo.

3. ANTECEDENTES

En los últimos años se han realizado diversas investigaciones con el fin de encontrar subproductos de la industria alimentaria que sirvan como base de medios de cultivo que puedan sustituir a los medios comerciales ya existentes como MRS y que proporcionen valores de productividad mejor o similar a éstos. Dentro de estas investigaciones encontramos la de Todorov and Dicks (2007) quienes aislaron una cepa de *Lactobacillus pentosus* ST712BZ, creciéndola en un medio con 10% p/v melaza a 30 °C obteniendo una actividad de 200 UA/mL, siendo *Lactobacillus casei* el indicador. Metsoviti et al. (2011) estudiaron un sistema de producción de *Leuconostoc mesenteroides* E131 en medio MRS suplementado con melaza (20 - 30 g/L), 100 rpm, 37 °C, 24 h, encontrando un rango de actividad de 160 a 640 UA/mL frente a *Listeria monocytogenes*. Por su parte Todorov (2008) estudió la actividad de *Lactobacillus plantarum* AMA-K contra *Listeria* sp. empleando un medio a base de 10% p/v melaza e incubando a 30 °C, la actividad reportada fue de 800 UA/mL.

López-Ortega (2014), en trabajo precedente a éste, encontró que *Streptococcus* sp. aislada de pozol presentó una máxima actividad de 3,498 UA/mL a la 6 h de fermentación, en biorreactor de 2.4 L, empleando un medio a base de lactosuero y evaluando la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*.

4. JUSTIFICACIÓN

La creciente demanda de los consumidores por encontrar productos mínimamente procesados, libres de aditivos y conservadores químicos pero que a su vez puedan garantizar buenas cualidades sensoriales e inocuidad, ha estimulado la búsqueda de alternativas en el campo de la bioconservación, donde uno de los propósitos es emplear la microbiota natural de alimentos o bien los productos metabólicos de ésta, con el fin de inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables y extender la vida de anaquel de los alimentos. En este sentido el uso de bacteriocinas producidas por bacterias ácido lácticas (BAL) para la conservación de alimentos, resulta una práctica útil y beneficiosa debido a sus cualidades bactericidas y bacteriostáticas frente a algunos microorganismos patógenos, además de ser seguras para el consumo humano y su estabilidad durante los procesos de producción y almacenamiento de alimentos.

La mayoría de las investigaciones para la producción de bacteriocinas a partir de BAL a nivel laboratorio, está limitada al uso de medios comerciales complejos, ricos en nutrientes y capaces de satisfacer sus altas exigencias, esto trae como consecuencia que dichos medios sean costosos para la producción a gran escala, por lo que resulta de gran utilidad contar con sustratos económicos y de fácil obtención.

El uso de subproductos de la industria alimentaria para este fin ha sido poco aprovechado, sin embargo en México la producción de melaza, principal subproducto de la industria azucarera, es de alrededor de 1.7 millones de toneladas anuales, de las cuales el 48% representan azúcares reductores fermentables y el 0.95% nitrógeno, esto constituye una fuente rica principalmente en carbohidratos que pueden ser utilizados como sustrato para la bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius*. El uso de este sustrato, representaría una disminución en los costos de producción a nivel industrial, además de darle un valor agregado a la melaza mediante su uso como medio de cultivo alternativo para la producción de compuestos con actividad antimicrobiana.

5. OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo General

Evaluar el uso de melaza como base de un medio de cultivo alternativo para soportar el crecimiento de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* aislada de pozol, en fermentación a nivel biorreactor, con el fin de obtener compuestos antimicrobianos (CAM) capaces de inhibir el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y realizar la caracterización preliminar de dichos compuestos.

5.1.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana (AaM) producida en los caldos de fermentación de *S. infantarius*, mediante la obtención de sobrenadante concentrado y su acción frente a *Listeria monocytogenes*.
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos antimicrobianos producidos.
- Desarrollar una metodología para concentrar los compuestos con actividad antimicrobiana y determinar el peso molecular mediante electroforesis SDS-PAGE.
- Evaluar la separación de los CAM en cromatografía en gel y RP-HPLC, como parte del proceso de purificación e identificación de estos compuestos.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La preocupación de los consumidores acerca del posible efecto adverso de ciertos conservadores sobre la salud los ha llevado a exigir la parcial o completa remoción de aditivos y conservadores químicos en los alimentos, incrementando la demanda de alimentos lo más cercano posible a lo “natural”, con larga vida de anaquel y buenas cualidades sensoriales. Esta tendencia ha estimulado un interés renovado en la búsqueda y desarrollo de conservadores naturales que alarguen la vida de anaquel y permitan mantener la seguridad de los alimentos. Los Miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y de la Organización Mundial de la Salud (OMS) han expresado su preocupación por el grado de inocuidad de los alimentos, tanto a escala nacional como internacional. El aumento de la incidencia de enfermedades transmitidas por alimentos que se ha producido en las últimas décadas está al parecer relacionado en muchos países, con un aumento de las enfermedades ocasionadas por la presencia de microorganismos o contaminantes químicos en los alimentos.

En los últimos años numerosas investigaciones han reportado propiedades antimicrobianas de diversos compuestos obtenidos de plantas, especies, cortezas, tejidos animales y microorganismos, sin embargo muy pocos han sido explotados para su aplicación en los alimentos. Enfocándose únicamente en el caso de compuestos antimicrobianos a partir de microorganismos podemos destacar los producidos por bacterias ácido lácticas, donde las posibilidades son prácticamente infinitas debido al gran número de bacterias aquí agrupadas, sin embargo actualmente solo una bacteriocina producida por este grupo ha logrado colocarse dentro de la categoría GRAS y ya es usada como aditivo alimentario para la conservación de algunos alimentos.

Por otro lado la producción de bacterias ácido lácticas y, específicamente, la producción de bacteriocinas es un proceso fastidioso debido a la necesidad de usar medios de cultivos ricos en nutrientes, tales como carbohidratos,

minerales, vitaminas y, algunos, aminoácidos, proteínas o hidrolizados proteicos. En experimentos a nivel laboratorio, las BAL son comúnmente cultivadas en medios como MRS y M17, pero éstos difícilmente podrían ser escalados a nivel industrial por lo caro que resultaría el utilizar estos medios de cultivo. Así, los medios complejos de alto costo podrían ser reemplazados por medios de bajos costo para promover el uso comercial de estas biomoléculas, lo cual implica diseñar/rediseñar los procesos industriales de producción de sustancias con actividad antimicrobiana. En este sentido y para otorgar un valor agregado a subproductos como la melaza, se ha planteado su uso como medio de cultivo alternativo (i.e., fuentes de carbono y nitrógeno) para la producción de sustancias con actividad antimicrobiana a partir de la bacteria ácido láctica *Streptococcus infantarius* aislada de pozol en biorreactor agitado mecánicamente.

7. HIPOTESIS

Es posible usar melazas como ingrediente importante de medios de cultivo para soportar el crecimiento de la bacteria ácido-láctica, *Streptococcus infantarius*, aislada de pozol, con la consecuente producción de sustancias con actividad antimicrobiana. Las sustancias antimicrobiana producidas serán eficaces contra organismos patógenos indicadores de importancia en la industria de los alimentos, como *Listeria monocytogenes*, lo que dará cuenta de su potencial aplicación.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Material biológico

8.1.1 Bacteria productora de compuestos antimicrobianos

Como microorganismo productor de compuestos antimicrobianos (CAM) se empleó la bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius* (ésta será referida como BAL1), aislada del *pozo* y proporcionada por la Dra. Gloria Díaz Ruíz de la Facultad de Química de la UNAM (Mendoza-Mendoza, 2012; Mendoza-Mendoza et al., 2013). La BAL1 fue preservada en viales de conservación de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo MRS) a -80 °C (Ultracongelador REVCO). Para reactivar la BAL1 se descongeló un vial con el cual se inocularon 5 mL de caldo MRS estéril (BD Difco®) (1% v/v), dándole un periodo de incubación de 24 h a 30 °C.

8.1.2 Caracterización bioquímica de la BAL1

Para conocer más acerca de las características de la BAL1 productora de CAM, se realizaron distintas pruebas bioquímicas mediante un sistema API 20 Strep (Biomérieux®), el cual es un sistema estandarizado que asocia 20 ensayos bioquímicos de un gran poder discriminante. Se compone de 20 cámaras que contienen los substratos deshidratados para la detección de actividades enzimáticas o de fermentación de azúcares. La realización de esta prueba se llevó a cabo siguiendo el manual de instrucciones del producto proporcionado por Biomérieux®.

8.1.3 Bacteria indicadora de actividad antimicrobiana

Para evaluar la actividad antimicrobiana (AaM) producida por la BAL1 se empleó como microorganismo indicador a *Listeria monocytogenes* CFQ-B-104 (*Lm*) proporcionada por el Cepario de la Facultad de Química de la UNAM a través de la Dra. Gloria Ruiz Díaz. *Lm* se preservó en viales de conservación de 1.5 mL (20% v/v glicerol, 80% v/v caldo de fermentación de *Lm* en BHI) a -80 °C (Ultracongelador REVCO). Para su activación se descongeló un vial de conservación y con él se inocularon 5 mL de caldo BHI estéril (Bioxon®) (1% v/v), dándole un periodo de incubación de 24 h a 30 °C.

8.2 Medios de cultivo

El medio de producción (MMP) se formuló con 4% p/v melaza, 2% p/v caldo soya tripticasa (Bioxon), 0.5% p/v extracto de levadura (Bioxon®), 0.3% p/v Tween 80 (Merck Millipore) y 1.4×10^{-3} % p/v $MnCl_2$ (J.T. Baker) (López-Ortega, 2014). Como medio de referencia para comparación de la AaM obtenida así como pruebas de concentración mínima inhibitoria y purificación de los CAM se empleó caldo MRS (BD Difco®). Ambos medios se prepararon con agua desionizada y fueron esterilizados a 121 °C por 15 min en autoclave Tuttnauer 3545 E. Para las fermentaciones a nivel biorreactor, los medios se esterilizaron a 15 psig durante 60 min en autoclave Felisa FE-399.

8.3 Fermentación en biorreactor

8.3.1 Condiciones de fermentación

Se descongeló un vial de conservación de BAL1, tomando 240 µL para inocular 24 mL de caldo MRS estéril (1% v/v), el cual se incubó por 24 h a 30 °C sin agitación. Posteriormente, este cultivo se inoculó en 2.4 L de medio MMP previamente

esterilizado *in situ* en fermentador (Applikon Z61103CT04) ($V_T=3$ L; $D_T=129$ mm; 2 turbinas Rushton, $D=45$ mm) (Figura 4). La fermentación se llevó a cabo a 30 °C, 200 rpm y aireación de 1 L/min, tomando muestras de 100 mL a las 0, 3, 6, 9, 12 y 15 h, para evaluar concentración de biomasa (X , g/L), contenido de ácido láctico (g/L) y AaM (UA/mL). El pH y oxígeno disuelto (OD) fueron medidos a través de electrodos previamente calibrados, los cuales se acoplaron en el biorreactor antes de la esterilización del medio *in situ*. Los registros de temperatura (T), pH, OD y flujo de aire (L/min) fueron monitoreados de forma continua mediante una Bioconsola ADI 1030 (Figura 4) acoplada al software BioXpert (Versión 1.1x).



Figura 4. Fermentador autoclavable de 3L Applikon Z61103CT04 y bioconsola ADI 1030 (Laboratorio de Biotecnología, ICAp, UAEH).

8.3.2 Concentración de biomasa (X)

Muestras de 80 mL de cada tiempo evaluado fueron centrifugadas a 6,000 rpm, a 4 °C durante 40 min (Hermle Z323K), al pellet de biomasa obtenido se le realizaron dos lavados con solución isotónica (0.9% p/v NaCl) y se centrifugaron a 5,500 rpm, 4 °C durante 30 min. Posteriormente el pellet obtenido se llevó a peso seco (100 °C, 24 h) en un horno de convección (Drying Oven DHG-9075A).

La concentración de biomasa se calculó usando la Ecuación 1:

$$X = \frac{P_{t+x} - P_t}{V_m} \quad (1)$$

Donde X es la concentración de biomasa (g/L), P_t es el peso del tubo (g), P_{t+x} es el peso del tubo más biomasa (g) y V_m el volumen de la muestra (L). Estos datos se graficaron en función del tiempo. El sobrenadante libre de biomasa se conservó para ensayos de AaM y contenido de ácido láctico.

8.3.3 Fermentación en matraz

Para evaluación de la concentración mínima inhibitoria y purificación de los CAM, se realizaron fermentaciones en matraz usando caldo MRS (BD Difco®). Para ello, después de activar a la BAL1, incubándola por 24 h a 30 °C, se inocularon al 1% v/v, 500 mL de caldo MRS estéril, incubándose a 30 °C por 6 h en incubadora con agitación orbital a 150 rpm (Thermo Q5000). Una vez terminada la incubación, el caldo se distribuyó en tubos Corning de 50 mL y se centrifugaron a 5,500 rpm, 4 °C durante 30 min. La biomasa se desechó y el sobrenadante se concentró como se describe en el apartado siguiente.

8.4 Actividad antimicrobiana

8.4.1 Concentración de la actividad antimicrobiana

A 80 mL del sobrenadante obtenido después de eliminar la biomasa del caldo de fermentación, se le ajustó el pH a 6.5 con NaOH 5 M con el fin de evitar la interferencia del ácido láctico en la evaluación de la actividad antimicrobiana contra *Lm*, posteriormente se concentró en un rotavapor (Büchi R-215) a 60 °C, 35 rpm y 72 mbar, hasta obtener un volumen final de 31 mL (factor de concentración, 2.58). Finalmente, al concentrado se le dio un tratamiento térmico (110 °C, 10 min) para la inactivación de proteasas y se conservó a -80 °C (Ultracongelador REVCO).

8.4.2 Evaluación de la actividad antimicrobiana

Como microorganismo indicador de AaM se utilizó *Lm*. La activación de esta bacteria se realizó de forma similar a la BAL1, pero inoculando 50 µL en 5 mL de BHI estéril, e incubando a 35 °C por 24 h; posteriormente, se tomaron 50 µL de ese caldo para inocular 5 mL de BHI fresco el cual se incubó por 6 h a 35 °C (esto resulta en un cultivo de *Lm* en fase log, 10⁹ UFC/mL) (Mendoza-Mendoza, 2012; Rodríguez-Rodríguez & Cruz-Maldonado, 2011). De este caldo, se mezclaron 58 µL en 10 mL de agar BHI suave, los cuales se vertieron en una caja Petri estéril dejando reposar hasta la solidificación del agar. Una vez solidificado el medio, se realizó la prueba de difusión en agar por gota (ANEXO I), realizando diluciones 2ⁿ de los sobrenadantes concentrados correspondientes a las diferentes horas de muestreo (0, 3, 6, 9, 12 y 15 h); dichas diluciones se realizaron en tubos Eppendorf colocando 500 µL de los concentrados más 500 µL de agua destilada estéril, representando la dilución 2¹, posteriormente de esta dilución se tomaron 500 µL y se colocaron en otro tubo y se adicionaron otros 500 µL de agua

destilada estéril (dilución 2^2), se continuo de esta manera hasta la dilución 2^8 (Figura 5). Posteriormente se colocaron 10 μ L de estas diluciones sobre el agar inoculado y gelificado en las cajas Petri las cuales se incubaron a 35 °C durante 24 h. Transcurrido ese tiempo se midieron los halos de inhibición con un vernier (Fowler). Esta prueba fue realizada por duplicado.

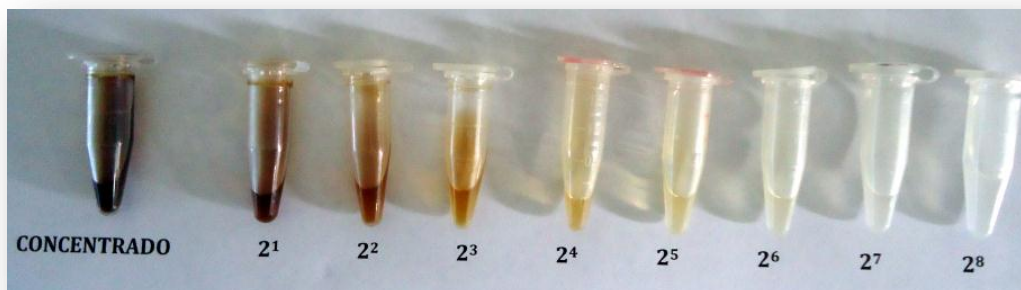


Figura 5. Diluciones 2^n de sobrenadante concentrado para cuantificación de la AaM (método de la dilución crítica).

8.4.3 Cuantificación de la actividad antimicrobiana

Para términos de cuantificación de la AaM, ésta se expresó en Unidades de Actividad por mililitro (UA/mL). Para el cálculo de las Unidades de Actividad (UA), se empleó la técnica de la dilución crítica (Figura 5) descrita por Nuñez, Tomillo, Gaya, and Medina (1996), donde se considera como una UA al recíproco de la dilución (2^n) más alta a la que se logra apreciar una zona de inhibición clara y bien definida del microorganismo indicador. En este trabajo de investigación se consideró una UA como el equivalente a un halo de inhibición con al menos 2 mm de radio.

8.4.4 Efecto de proteasas sobre la actividad antimicrobiana

Con el fin de confirmar la naturaleza proteica de las sustancias con actividad antimicrobiana, e identificarlas como bacteriocinas, se evaluó el efecto de la proteinasa K sobre la actividad antilisterial del sobrenadante concentrado libre de biomasa. Para ello se preparó una solución de proteinasa K (Invitrogen) de 1 mg/mL y en un tubo Eppendorf se colocaron 100 μ L de esta solución con 100 μ L de sobrenadante concentrado de caldo de fermentación libre de biomasa, posteriormente se incubó a 37 °C por 1 h. Pasado el tiempo de incubación se evaluó la actividad antimicrobiana contra *Lm* mediante la prueba de difusión en agar por gota descrita anteriormente. Se incluyó un control negativo (sobrenadante concentrado libre de biomasa sin tratamiento con proteinasa K) y un control positivo (solución de proteinasa K, 1 mg/mL + agua destilada).

8.5 Contenido de ácido láctico

Para evaluar la producción de ácido láctico a través del tiempo en el medio de fermentación, se prepararon diluciones 1:1 de los sobrenadantes obtenidos en los diferentes tiempos de muestreo, 3 mL de estas diluciones se colocaron en un matraz Erlenmeyer, se adicionaron 3 gotas de fenolftaleína como indicador y se tituló con NaOH 0.1 N hasta obtener un ligero vire rosa. Se midió el volumen gastado del titulante para determinar la concentración de ácido láctico en g/L mediante la Ecuación 2:

$$\text{Concentración de ácido láctico} = \frac{(V_{\text{NaOH}})(N)(P_{\text{eq}})}{V_{\text{muestra}}} \quad (2)$$

Donde V_{NaOH} es el gasto del agente titulante (mL), N es la normalidad, P_{eq} son los equivalentes gramo de la masa molar del ácido láctico ($\text{CH}_3\text{-CHOH-COOH}$) y V_{muestra} es la alícuota de muestra titulada (mL). La operación se realizó por triplicado para cada uno de los tiempos monitoreados.

8.6 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria del sobrenadante concentrado con CAM se determinó mediante el método reportado por Wiegand y colaboradores (Wiegand, Hilpert, & Hancock, 2008). La CMI está definida como la concentración más baja de un agente antimicrobiano que evita el crecimiento visible de un microorganismo (Andrews, 2001). El medio de cultivo empleado para la determinación de esta prueba fue agar Oxford (BD Difco®) y como microorganismo indicador se utilizó *Lm*. Para la evaluación se prepararon diluciones del sobrenadante concentrado obtenido mediante fermentación en caldo MRS (t=6 h) correspondientes a 80, 40, 20, 10, 5, y 2.5 UA/mL. Para asegurar que los CAM se encontraran en el medio de cultivo, las diluciones se realizaron directamente en el agar Oxford antes de gelificar (Figura 6), posteriormente se realizó el vertido en cajas Petri y se dejó solidificar en una campana de flujo laminar (Labconco®). Se prepararon 2 cajas de cada dilución evaluada así como del blanco (sin CAM). Por otro lado, se preparó un cultivo fresco de *Lm* del cual se inocularon 10^4 UFC por caja mediante el método de extensión en superficie. Se incubó a 35 °C y se monitoreo el crecimiento de *Lm* a las 16, 20, 24 y 48 h. La CMI debe ser evaluada después de un tiempo de incubación de 16 a 20 h (Wiegand et al., 2008), por lo que se consideró como la CMI la concentración mínima a la cual no se observó crecimiento de *Lm* después de 20 h de incubación, es decir a las 24 h.

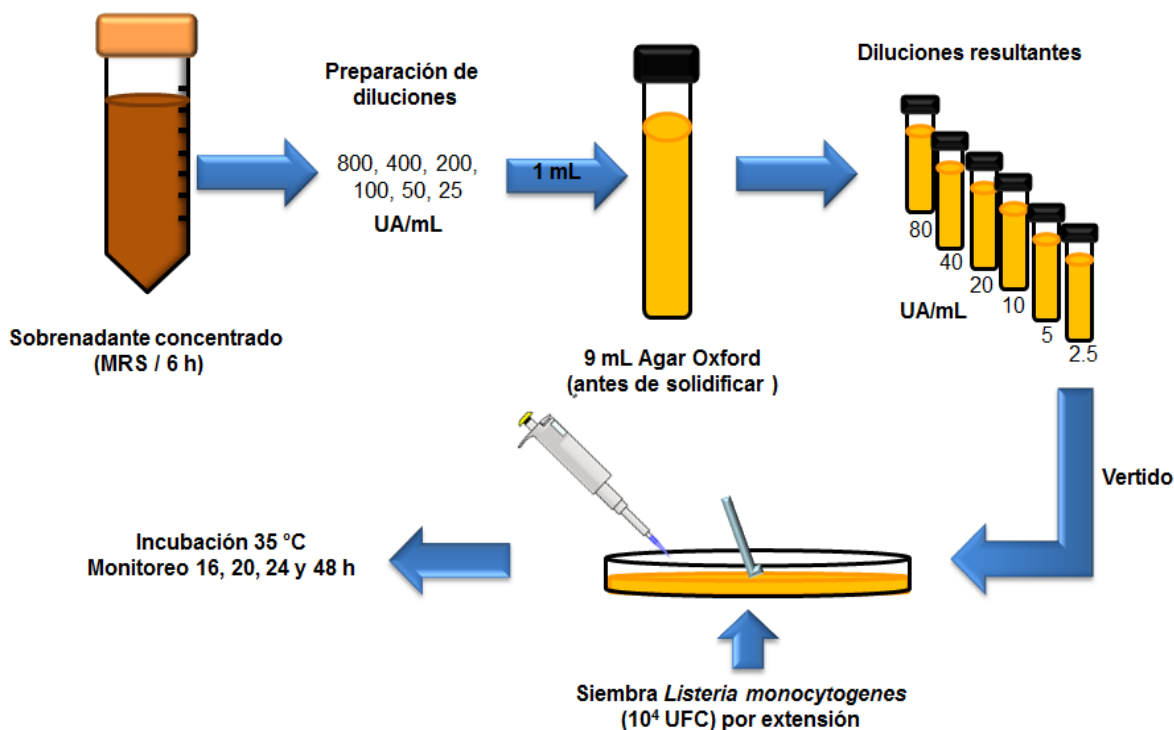


Figura 6. Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

8.7 Purificación de sustancias con actividad antimicrobiana

8.7.1 Determinación del porcentaje de saturación de sulfato de amonio

El porcentaje de saturación óptimo para la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se determinó mediante una precipitación gradual, con el fin de identificar el rango en el que era precipitada la fracción con actividad antimicrobiana de interés. A 30 mL de sobrenadante concentrado libre de biomasa se le adicionaron 7.09 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (J.T. Baker®) para lograr un porcentaje de saturación del 40%, la adición del sulfato se realizó de forma lenta teniendo cuidado para evitar la formación de espuma y con agitación suave y constante por toda la noche a temperatura de refrigeración (8 °C). Al otro día se centrifugó a 10,000 g por 30 min

a 4 °C y se separó el pellet del sobrenadante; el pellet se resuspendió en 1.5 mL de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5 (ANEXO II), considerándose ésta como la fracción Ia (0 - 40%). Con el sobrenadante obtenido se llevó a cabo una segunda precipitación para alcanzar un porcentaje de saturación del 60%; para ello se adicionaron 3.79 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a dicho sobrenadante y posteriormente se realizaron los mismos pasos que en la fracción Ia, obteniéndose la fracción IIa (40 - 60%). Por último se realizó una tercera precipitación con el sobrenadante de la fracción IIa para alcanzar un porcentaje del 80%, adicionando 4.06 g de sulfato y siguiendo los pasos descritos anteriormente, el pellet resuspendido que se obtuvo se identificó como fracción IIIa.

Se evaluó la AaM de las tres fracciones obtenidas mediante la prueba de difusión en agar por gota descrita en el apartado 8.4.2 y se seleccionó el porcentaje de saturación en el cual los CAM lograban precipitar en su totalidad para realizar las pruebas posteriores.

8.7.2 Precipitación con sulfato de amonio

Una vez realizada la determinación de la concentración óptima de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para la precipitación de los CAM, se identificó que éstos lograban precipitar totalmente en el rango de 40 - 60%, correspondiente a la fracción IIa, la evaluación de la AaM de esta fracción mostró un pequeño halo de inhibición contra *Lm* hasta la dilución 2^1 , por lo que se decidió trabajar con un porcentaje de saturación del 50%.

Un volumen de 250 mL de sobrenadante concentrado de 6 h de fermentación en caldo MRS (BD Difco®) fue precipitado con 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (76.30 g), la adición del sulfato se realizó lentamente y con agitación suave y constante por toda la noche a temperatura de refrigeración (8 °C). Al otro día se centrifugó a 10,000 g por 30 min a 4 °C y se separó el pellet del sobrenadante; el pellet se resuspendió en 7 mL de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5.

8.7.3 Precipitación con acetona

El volumen resuspendido obtenido después de la precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ fue precipitado nuevamente con acetona, para lo cual se adicionaron lentamente 4 volúmenes de acetona fría ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) y se mezcló en un vortex, posteriormente se incubó a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ por 60 min, una vez pasado este tiempo se centrifugó a $13,000\text{ g}$ por 10 min y se decantó teniendo cuidado de no romper el pellet. El tubo con el pellet permaneció abierto en una campana de flujo laminar hasta que los restos de acetona se evaporaron y el olor ya no fue perceptible. Una vez eliminada la acetona el pellet se resuspendió en 3 mL de buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5.

8.7.4 Eliminación de sales por diálisis

El producto resuspendido de la precipitación con acetona se sometió a diálisis empleando membranas de celulosa con un tamaño de poro de 1000 Da (Spectra/Por[®] 7). La diálisis se realizó a temperatura de refrigeración ($8\text{ }^\circ\text{C}$) con agitación constante por 18 h, como medio de intercambio se utilizó buffer de fosfatos 0.1 M a pH 6.5, el cual fue cambiado periódicamente hasta el término de la diálisis. Finalmente fue filtrado a través de membranas estériles Millipore (Durapore[®] Membrane Filters, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ GV, Irlanda) y se conservó a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. El volumen obtenido se denominó como Fracción Ib.

8.7.5 Cromatografía de filtración en gel

La fracción Ib fue sometida a un segundo paso de purificación mediante cromatografía de filtración en gel (Figura 7). Esta etapa se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología de Proteínas del CINVESTAV, Zacatenco bajo la dirección del Dr. Jaime Ortega. Se empleó una columna Econo-Column[®] Bio-Rad ($1.5 \times 30\text{ cm}$), la cual fue bien lavada con agua destilada y secada. Posteriormente se adicionaron en la columna 10 mL de agua destilada y enseguida lentamente 35

mL de resina Bio-Gel ® P30 de Bio-Rad (2,500 - 40,000 MW) evitando la formación de burbujas, se dejó sedimentar la resina y una vez compactada se eliminó el agua abriendo la llave de flujo de la columna y se adicionó más resina hasta completar un volumen compactado de 35 mL. La columna se conectó a un cromatógrafo Biologic HR Workstation Bio-Rad y se realizó un lavado haciendo pasar un volumen de agua destilada equivalente al de la resina (35 mL). Enseguida se pasó buffer de fosfatos 0.1 M, pH 6.5 hasta que la curva de conductividad se mostrara constante indicando el equilibrio. Una vez lista la columna, se cargaron 4 mL de la fracción Ib y se recolectaron fracciones de 2 mL hasta que paso el volumen total de la columna (35 mL), obteniéndose alrededor de 18 fracciones, a las cuales se les evaluó la AaM como se describe en el apartado 8.3.5, y aquellas que presentaron actividad antimicrobiana fueron reunidas en una sola fracción denominándose Fracción IIb. Una vez que se terminó de usar la columna se lavó pasando agua destilada y se conservó con azida de sodio 0.05%.

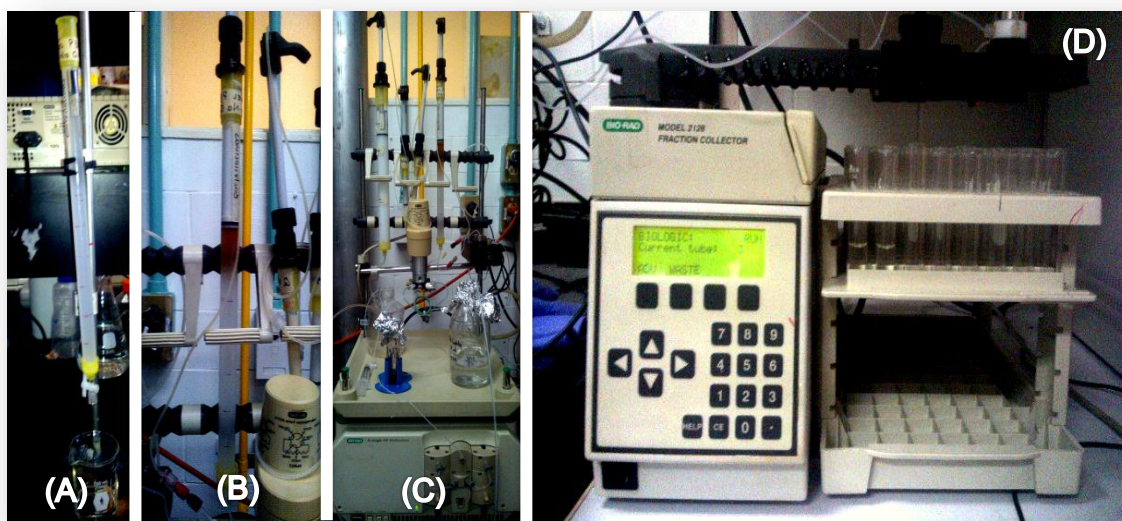


Figura 7. Cromatografía de filtración en gel: (A) Preparación de columna; (B) Inyección de Fracción Ib; (C) Conexión de columna a cromatógrafo Biologic HR Workstation; (D) Recolección de fracciones.

8.7.6 RP-HPLC

Un volumen de 10 μ L de la Fracción IIb, obtenido mediante cromatografía de filtración en gel, fue cargado en una columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4.6 x 50 mm x 2.7 μ m) conectada a un equipo de HPLC (Agilent 1260, USA) (Figura 8). La elución fue realizada mediante dos soluciones A (30% acetonitrilo / 0.1% ácido trifluoracético (TFA)) y B (agua destilada / 0.1% TFA) previamente filtradas y desgasificadas, con un flujo de 0.5 mL/min. La recuperación de las fracciones eluidas se realizó a una absorbancia de 230 nm. Las fracciones recuperadas fueron evaporadas (60 °C/10 h) y resuspendidas en buffer de fosfato pH 6.5, 0.1 M. La AaM de las fracciones obtenidas fue evaluada utilizando *Lm* como indicador (apartado 8.4.2) y se denominó como Fracción IIIb a aquella que exhibió actividad. Pediocina (Sigma Aldrich) fue utilizada como estándar para identificar los tiempos de retención aproximados.



Figura 8. Cromatógrafo Agilent 1260 Infinity (Laboratorio de Microbiología, ICAp, UAEH).

8.7.7 Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida

Se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS) de las fracciones Ib, IIb y IIIb. Las dimensiones de los geles fueron 8 cm x 10 cm x 1.5 mm. Con el fin de lograr una mejor separación, para análisis de las fracciones Ib y IIb el gel separador consistió de dos secciones, la inferior de 16% y la superior de 13%, para la fracción IIIb este gel se preparó de 16.5%, el gel concentrador para las tres fracciones fue de 4% (ANEXO III). Una vez solidificado el gel se colocó en la cubeta de electroforesis y se cargaron 20 μ L de las 3 fracciones mencionadas anteriormente, 10 μ L de marcador molecular Precision Plus Protein Dual Xtra Standards de Bio-Rad (2 – 250 kDa) y 10 μ L de pediocina (Sigma Aldrich®) como indicador. Se aplicó un voltaje de 50 V por 20 min y posteriormente se aumentó a 100 V por 3 h. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie durante 30 min (Figura 9), posteriormente se destiñeron con una solución de metanol (45%) y ácido acético (10%) hasta que el colorante quedó en la solución. Para su conservación, los geles se guardaron en recipientes herméticos con un volumen suficiente de agua destilada estéril para cubrirlos completamente.

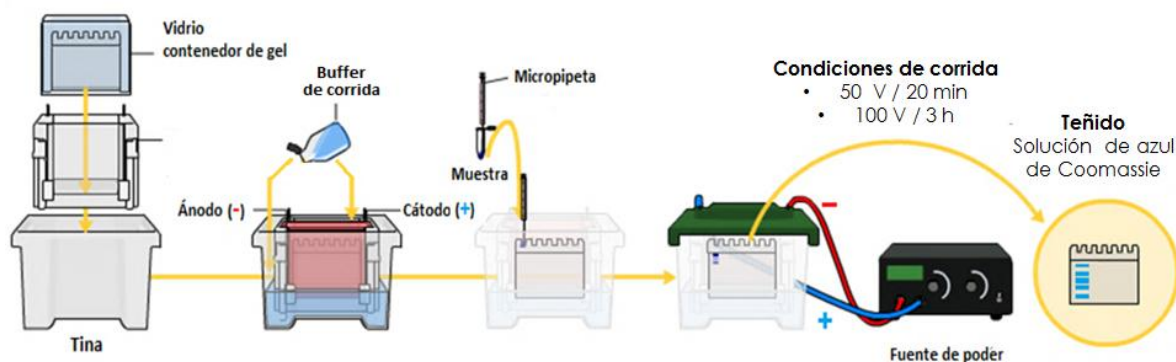


Figura 9. Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE).

8.7.8 Actividad antimicrobiana en geles de poliacrilamida

Para detectar la actividad inhibitoria de los CAM separados a su paso por los geles de poliacrilamida, se siguió básicamente el método de Bhunia, Johnson, and Ray (1987). Una vez transcurrida la electroforesis, los geles se lavaron durante 3 h en agua destilada estéril a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar y se cortaron las secciones donde se observó una banda correspondiente a las fracciones evaluadas. Posteriormente, en una caja Petri se preparó una cama de 10 mL de agar BHI y se dejó solidificar, en ella se colocaron las secciones cortadas del gel y se cubrieron con una capa de 10 mL de agar BHI suave inoculado con *L. monocytogenes* (10^9 UFC/mL) (ANEXO IV). Las placas se incubaron durante 24 h a 35 °C y se observó si las fracciones presentaban zonas de inhibición.

8.8 Análisis estadístico

Los resultados cuantitativos obtenidos fueron examinados por medio del análisis de varianza (ANOVA) a fin de determinar diferencias significativas a un nivel de significancia de $\alpha=0.05$.

9. RESULTADOS Y DISCUSIONES

9.1 Caracterización bioquímica de la BAL1

De acuerdo a investigaciones realizadas dentro del grupo de trabajo anteriormente, mediante análisis del gen ADNr 16S, se ha reportado que la BAL1 pertenece al género *Streptococcus* (Mendoza-Mendoza et al., 2013), complementario a esto, en investigaciones más recientes (no publicadas), mediante análisis del gen de la superóxido dismutasa A (sodA) se ha revelado que la BAL1 se trata de un *Streptococcus infantarius*. Sin embargo para propósitos de este trabajo seguirá nombrándose como BAL1.

Para conocer más acerca de las características bioquímicas de la BAL1 productora de CAM, se realizaron distintas pruebas bioquímicas mediante un sistema API 20 Strep (Biomérieux®), las reacciones enzimáticas y fermentación de azúcares que componen el sistema API se detallan en el Cuadro 7 así como los resultados obtenidos.

Cuadro 7. Comparativo de resultados para pruebas bioquímicas de la BAL1 obtenidos mediante sistema API 20 Strep (presente trabajo) y algunos datos reportados por otros autores para *Streptococcus infantarius* (Romero-Hernández, del Campo, & Cantón, 2013; Schlegel et al., 2000; Schlegel, Grimont, Grimont, & Bouvet, 2004).

Test	Reacción enzimática	API 20 Strep	Reportado en literatura
VP	Voges Proskauer	+	+
HIP	Hidrólisis (ácido Hipúrico)	-	NM
ESC	Hidrólisis β -glucosidasa (Esculina)	-	V
PYRA	Pirolidonil arilamidasa	-	NM
α GAL	α -Galactosidasa	+	+
β GUR	β -Glucuronidasa	-	-
β GAL	β -Galactosidasa	-	-
PAL	Fosfatasa alcalina	-	NM

LAP	Leucina aminopeptidasa	+	NM
ADH	Arginina Dihidrolasa	-	NM
RIB	Acidificación Ribosa	-	-
ARA	Acidificación Arabinosa	-	-
MAN	Acidificación Manitol	-	-
SOR	Acidificación Sorbitol	-	-
LAC	Acidificación Lactosa	-	+
TRE	Acidificación Trehalosa	+	-
INU	Acidificación Inulina	-	-
RAF	Acidificación Rafinosa	+	V
AMD	Acidificación Almidón	+	V
GLYG	Acidificación Glicógeno	-	V
βHEM	Hemólisis	-	-

(NM) No mencionado; (V) Resultado variable; (+) Prueba positiva; (-) Prueba negativa, después de 24 h de incubación a 35 °C.

En algunos trabajos de investigación publicados por Romero-Hernández, del Campo, & Cantón, Schlegel, *et al.*, y Schlegel, Grimont, Grimont, & Bouvet (Romero-Hernández *et al.*, 2013; Schlegel *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 2004) se mencionan ciertas características bioquímicas representativas de *Streptococcus infantarius*; haciendo un comparativo con lo encontrado en el presente trabajo (Cuadro 7), podemos destacar resultados positivos (+) para las pruebas α-Galactosidasa (αGAL, coloración violeta) y la prueba de Voges Proskauer (VP, coloración roja), la cual consiste en la detección de acetoína como resultado de la fermentación de la glucosa (Eddy, 1961), así como resultados negativos (-) para las pruebas β-Glucuronidasa, β-Galactosidasa (βGUR y βGAL respectivamente, incoloro), β-Hemólisis y acidificación de azúcares como ribosa, arabinosa, manitol, sorbitol e inulina (RIB, ARA, MAN, SOR e INU respectivamente, coloración roja) (Figura 10), dicha comparación resulta concordante con lo observado por otros autores para *S. infantarius*, con excepción de las pruebas de acidificación de lactosa (LAC) y Trehalosa (TRE), donde los resultados son distintos; sin embargo,

basándonos también en los análisis previos de los genes ADNr 16S y SodA, es probable que la BAL1 sea una variante nativa de la especie *Streptococcus infantarius*, que como ya se ha mencionado fue aislada de la bebida mexicana llamada pozol (Tavera-Montes, 2010). Sin embargo, se deben realizar más estudios para confirmar plenamente la identidad de la BAL1 usada en esta investigación.



Figura 10. Detección de actividad enzimática o fermentación de azúcares en sistema API 20 Strep, compuesto por 20 microtubos.

9.2 Fermentación en biorreactor

9.2.1 Evolución de la biomasa de BAL1

La Figura 11a muestra la cinética de crecimiento de la BAL1 obtenida en las fermentaciones en biorreactor agitado mecánicamente usando medio conteniendo melaza (4% p/v) a condiciones de 200 rpm, aireación 1 L/min y 30 °C. La concentración inicial de BAL1 fue de 0.38 g/L (Desviación estándar, DE=0.12), alcanzándose la máxima concentración de biomasa desde las 6 h (1.17 g/L, DE=0.17), misma que ya no sufrió cambios significativos durante el resto del proceso ($P < 0.05$). Todos los datos de concentración de biomasa obtenidos fueron ajustados al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, mediante el programa SigmaPlot v. 12.5, obteniéndose un coeficiente $R^2 = 0.81$ asociado con la siguiente ecuación,

$$X=0.3422+\frac{0.8490}{\left(1+e^{\frac{-t-3.5670}{1.0971}}\right)} \quad (3)$$

Con base en la Ecuación (3), mediante el programa MathCAD v. 14, se determinaron las evoluciones de la velocidad de crecimiento (dX/dt ; g/(L h)) y de la velocidad específica de crecimiento ($\mu = dX/dt \cdot 1/X$; h⁻¹), exhibidas en las Figuras 11b y 11c, respectivamente. La $\mu_{\text{máx}}$ fue 0.28 h⁻¹. En investigaciones previas a este trabajo López-Ortega (2014), realizó el crecimiento de la BAL1 a las mismas condiciones de fermentación que en este estudio, pero usando un medio de cultivo a base de lactosuero, se encontraron mayores valores de $X_{\text{máx}}$ y $\mu_{\text{máx}}$ que los reportados en este trabajo (1.65 g/L y 0.56 h⁻¹, respectivamente) lo cual debe ser resultado de que el medio MCA-II usado por López-Ortega (López-Ortega, 2014) promovió una mayor producción de biomasa de BAL1, probablemente debido a una mayor afinidad de la bacteria por las fuentes de nutrimentos encontradas en el medio a base de lactosuero. En la literatura existen pocos trabajos acerca del cultivo de BAL en medios con melazas a nivel de fermentador. En este sentido se ha reportado la producción de ácido láctico por *Enterococcus faecalis* (Wee et al., 2004), por *Lactobacillus delbrueckii* (Dumbrepatil et al., 2007) y por *Lactococcus lactis* (Meziane, 2011). Sin embargo, son aún menos frecuentes los reportes sobre la producción de bacteriocinas de BAL en medios a base de melaza (Metsoviti et al., 2011; Todorov & Dicks, 2007), encontrándose estudios con *Leuconostoc mesenteroides* E131 y con *Lactobacillus pentosus* ST712BZ, pero no con BAL pertenecientes al género *Streptococcus*.

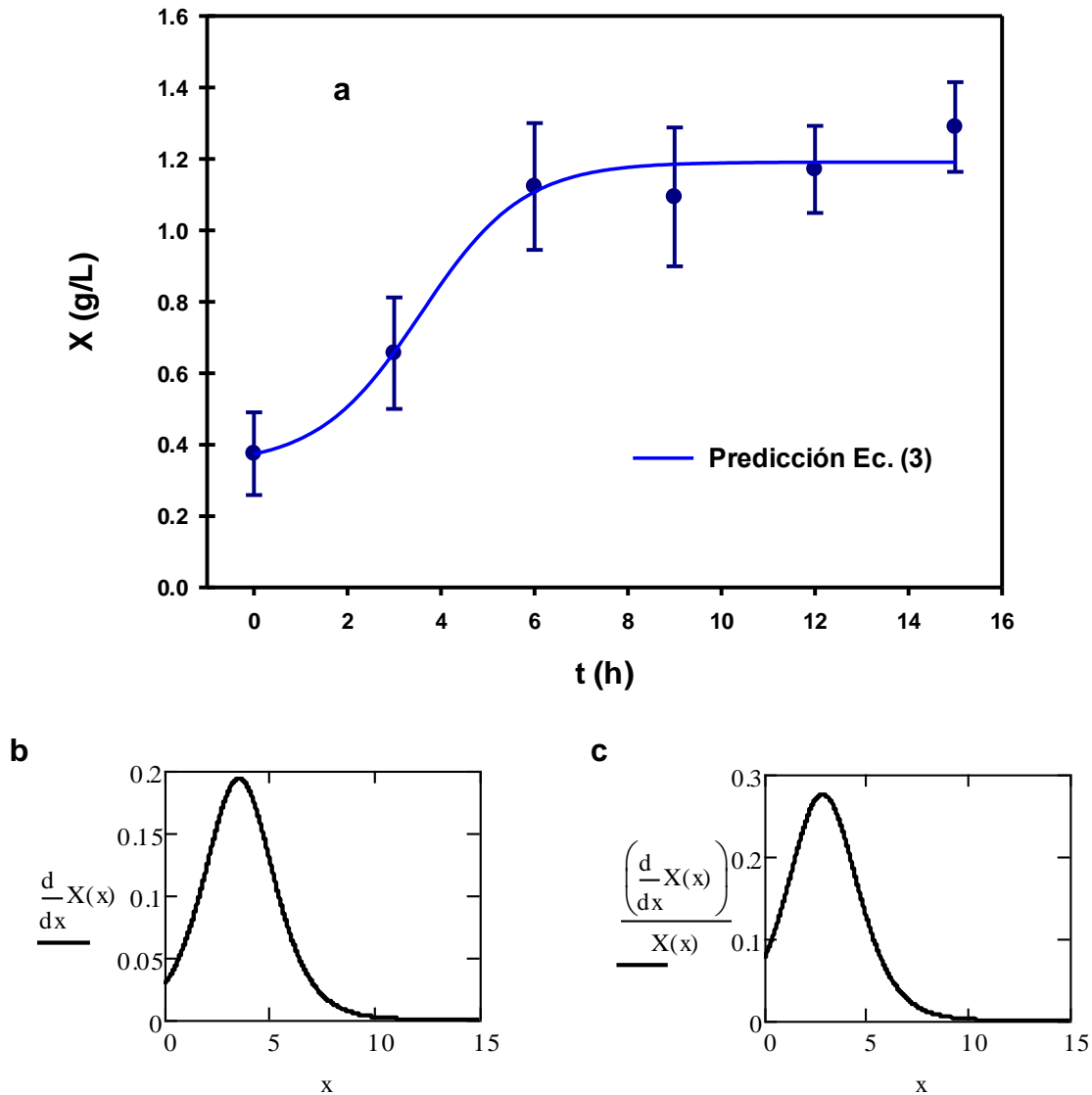


Figura 11. Cinética de crecimiento de la BAL1 en medio de cultivo MMP que contiene 4% p/v melaza, en fermentaciones por cuadruplicado en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30 °C. a) Evolución de la concentración de biomasa mostrando el mejor ajuste de todos los datos al modelo Sigmoidal de 4 parámetros (Ec. 3). Con base en la Ecuación 3, predicciones de: b) velocidad de producción de biomasa ($g/(L h)$), y c) velocidad específica de crecimiento (h^{-1}).

Por otra parte, si existen publicados diversos trabajos con enfoques cualitativos y cuantitativos, referentes a la producción de bacteriocinas por cepas del género *Streptococcus* creciendo en medios complejos que no contienen melazas: *S. bovis*

(Iverson & Millis, 1976; Mantovani, Kam, Ha, & Russell, 2001), *S. infantarius* (Jans et al., 2012), *S. macedonicus* ACA-DC 198 (Maragkoudakis et al., 2009) y *Streptococcus phocae* PI80 (Arul, 2009) , entre otros artículos relevantes en el tema.

9.2.2 Evolución de pH y concentración de ácido láctico

La cuantificación de ácido láctico en las fermentaciones fue determinada por titulación con solución valorada de NaOH 0.01 N y fenolftaleína como indicador. La Figura 12a presenta la evolución de la concentración de ácido láctico en las fermentaciones de BAL1 creciendo en medio con melaza. La BAL1 pertenece al género *Streptococcus*, las cuales son BAL homolácticas (Prescott, Harley, & Klein, 2002), capaces de producir ácido láctico como producto principal de la conversión de fuentes de carbono disponibles en el medio, como glucosa y/o lactosa, lo cual puede ocasionar un importante descenso del pH como se ve en la Figura 12c. El pH al iniciar la fermentación fue 6.2 (DE=0.1), descendiendo de forma importante de manera que a las 9 h, éste ya era 4.1 (DE=0.1), el cual ya no cambió de forma significativa el resto de proceso. Iverson y Millis (Iverson & Millis, 1976) estudiando la producción de bacteriocinas por 47 aislados de la especie *Streptococcus bovis*, así como probando cinco medios de cultivo, al final de las fermentaciones registraron valores de pH entre 4.2 y 4.4 cuando sus especímenes crecieron en medio compuesto por 0.5% (p/v) glucosa y 0.05 M buffer TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etano sulfónico). Por otra parte, Jans y colaboradores han reportado que el cultivo de *S. infantarius* subespecie *infantarius* CJ244, aislado en África, acidula medios con lactosa con pH inicial de 6.8 hasta 4.54 cuando el cultivo se lleva en condiciones de agitación orbital de 140 rpm y 37 °C (Jans et al., 2012). Sabiendo que *Streptococcus* spp. son heterótrofos que fermentan azúcares para producir ácido láctico, sin gas, como el mayor producto - por ser una BAL homoláctica (Prescott et al., 2002)-, resulta lógico esperar un descenso importante en el pH en el desarrollo de fermentaciones de la BAL1, lo

cual es coincidente con lo reportado por otros autores al realizar estudios con otras especies de *Streptococcus* (Iverson & Millis, 1976; Jans et al., 2012).

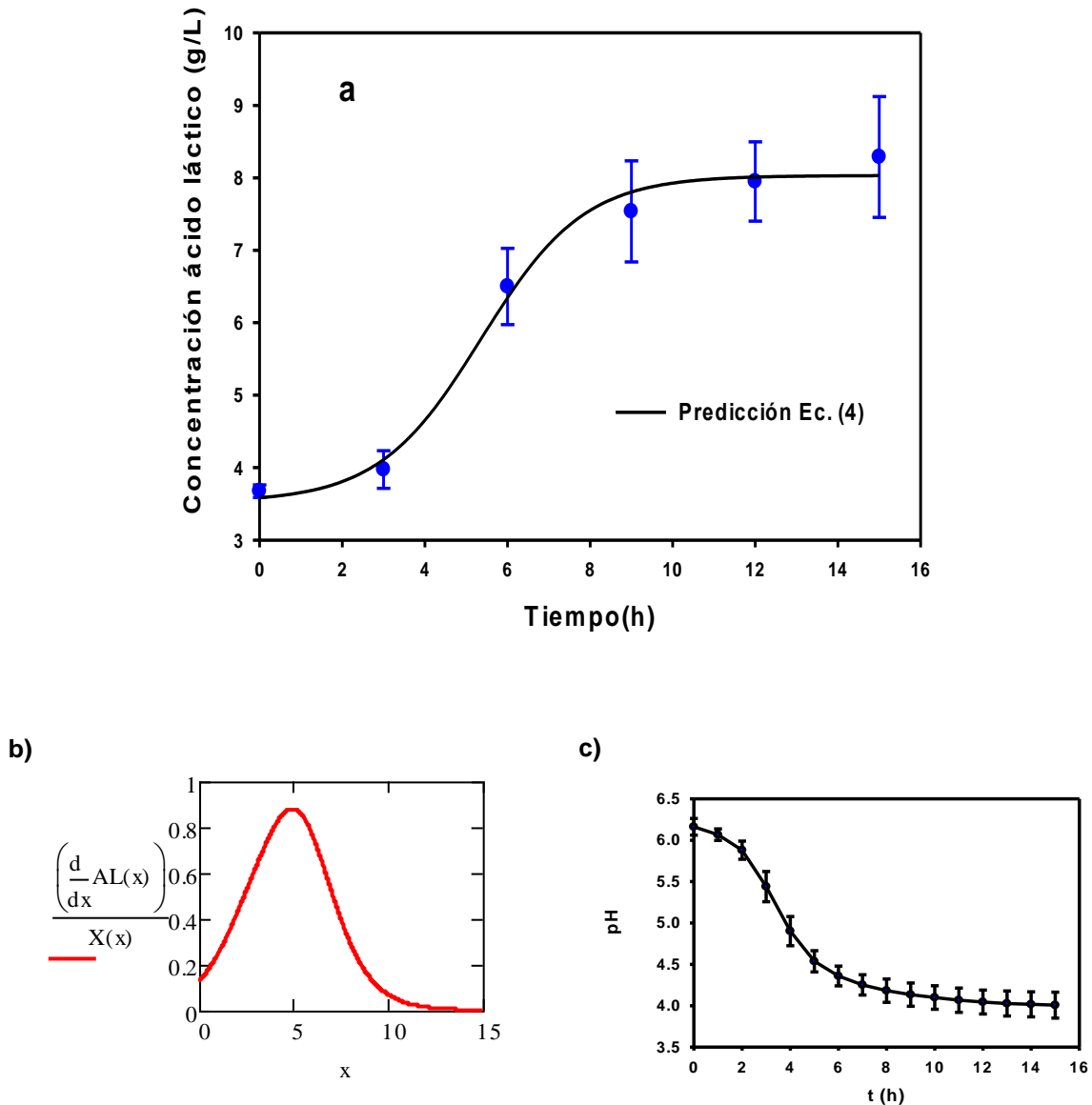


Figura 12. Cinética de producción de ácido láctico durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo con 4% p/v melaza, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30 °C. a) Evolución de la concentración de ácido láctico mostrando el mejor ajuste de los datos al modelo Sigmoide de 4 parámetros (Ecuación 4); b) velocidad específica de producción de ácido láctico ($\text{g}_{\text{ácido láctico}}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ h})$); y c) evolución del pH durante las fermentaciones.

Al inicio de las fermentaciones la concentración de ácido láctico fue 3.68 g/L (DE=0.09) y ésta se incrementó notablemente hasta 7.53 g/L (DE=0.7) a t=9 h, la cual ya no cambió significativamente el resto del proceso. Los datos de concentración de ácido láctico obtenidos fueron ajustados al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, mediante el programa SigmaPlot v. 12.5, obteniéndose la Ecuación 4 asociada con R²=0.93.

$$AL=3.5257+\frac{4.5067}{\left(1+e^{-\frac{t-5.3624}{1.2424}}\right)} \quad (4)$$

Por otra parte, con base en la Ecuación (4), mediante el programa MathCAD v. 14, se determinó la evolución de la velocidad específica de producción de ácido láctico ($R_{AL} = \frac{d(AL)}{dt} \cdot \frac{1}{X}$; g_{ácido láctico}/(g_{biomasa} h)), exhibida en la Figura 12b, donde el máximo valor registrado fue R_{AL,máx}=0.88 g_{ácido láctico}/(g_{biomasa} h) aproximadamente en t=5 h. En un estudio realizado por López-Ortega (2014), propago la BAL1 a las mismas condiciones de proceso pero usando medios con lactosuero, logrando una mayor concentración de ácido láctico (7.87 g_{ácido láctico}/L, DE=0.14) así como un valor mayor de R_{AL,máx} (1.49 g_{ácido láctico}/(g_{biomasa} h)). No existen reportes de valores de R_{AL,máx} durante fermentaciones con *Streptococcus* para la producción de bacteriocinas utilizando medios con melazas. No obstante, es interesante mencionar algunos datos relacionados, aunque los especímenes o medios de cultivo utilizados hayan sido diferentes de lo relativo al presente trabajo. Por ejemplo, Wee y colaboradores (Wee et al., 2004) reportaron la producción de ácido láctico en fermentaciones de *Enterococcus faecalis* en medios con 13% p/v melazas, en tanque agitado a 200 rpm, 38 °C y control de pH a 7, logrando alcanzar 85 g_{ácido láctico}/L en 15 h de proceso. Por otra parte, Aktypis y colaboradores (Aktypis, Tychowski, Kalantzopoulos, & Aggelis, 2007) estudiaron la producción de la bacteriocina termofilina T producida por *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 en cultivos por lote en biorreactor, usando medios

complejos sin melazas, a 37 °C, 50 rpm y pH controlado en 6.2, determinando concentraciones de ácido láctico de 9 g_{ácido láctico}/L a las 15 h, resultando estos valores muy parecidos a lo que observamos en la presente investigación.

9.3 Evolución de la actividad antimicrobiana

La Figura 13 muestra los resultados de producción de actividad antimicrobiana en (UA/mL) exhibida durante las fermentaciones de BAL 1 creciendo en medio MMP con 4% p/v melazas, en fermentador agitado mecánicamente. A manera de control, también se presentan los resultados correspondientes utilizando medio MRS.

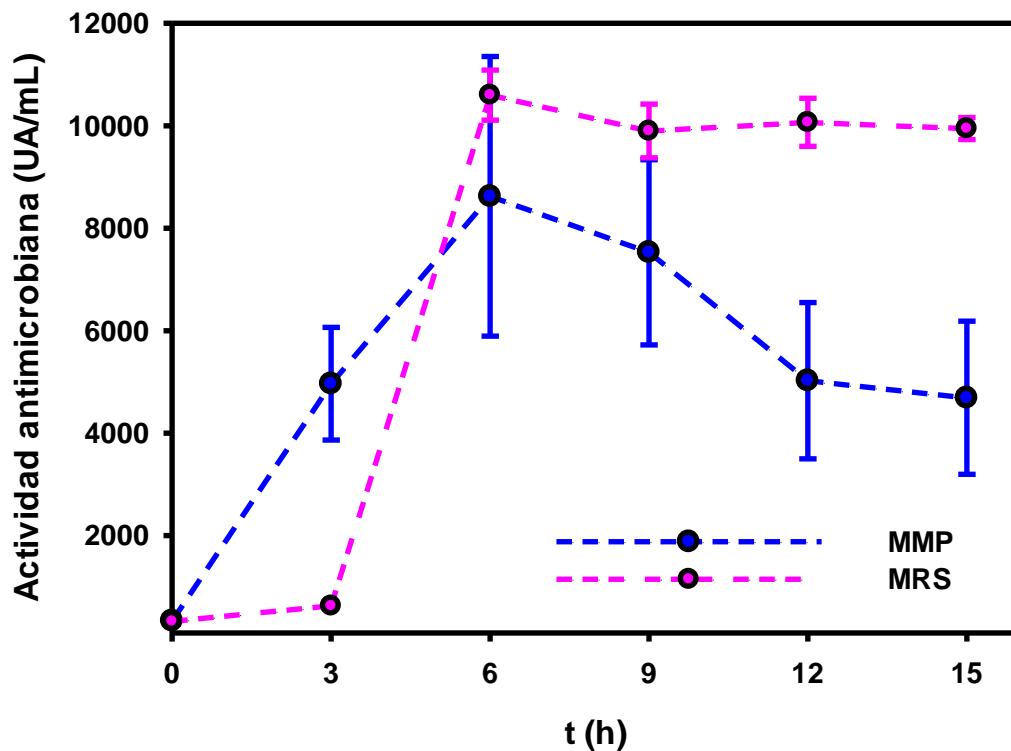


Figura 13. Cinética de actividad antimicrobiana durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo MMP con 4% p/v melaza, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) con aireación de 1 L/min y 30 °C. Se presentan también los resultados correspondientes cuando se usó medio MRS.

Puede observarse claramente que durante las primeras 6 h del proceso, la producción de actividad antimicrobiana mantuvo una relación proporcional con la cantidad de biomasa de BAL1 presente (Figura 11a), exhibiéndose el máximo de actividad en $t=6$ h: 8,624 UA/mL (DE=2,730) en medio MMP y 10,600 UA/mL (DE=488) en MRS; pasando este tiempo, la actividad tiende a disminuir siendo mayor la tasa de disminución en medio MMP, probablemente por la presencia de mayores actividades proteolíticas, entre otras posibilidades (a $t=15$ h, 4,691 UA/mL (DE=1,497) en medio MMP y 9,946 UA/mL (DE=215) en MRS). Por otra parte, la máxima actividad exhibida en MRS fue $(10,600/8,624)=1.23$ veces la determinada en medio MMP, lo cual hace pensar que la BAL1 tuvo una mayor “afinidad” por el medio MRS, complejo y muy nutritivo, pero también debe considerarse que aún no se realizan los estudios para la optimación del medio MMP. Además, con relación a la notable disminución de la actividad antilisterial registrada después de las 6 h de proceso, particularmente usando el medio MMP, en trabajos relacionados se han observado situaciones muy similares. Por ejemplo, Aktypis y colaboradores (Aktypis et al., 2007) observaron una notable disminución de la actividad de termophilina T durante cultivos de *S. thermophilus* ACA-DC 0040 en medios complejos (Figura 14).

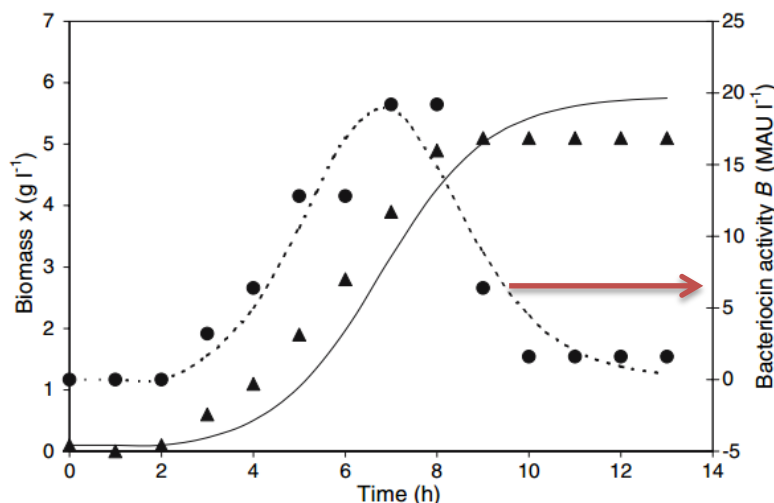


Figura 14. Actividad bacteriocina producida por *S. thermophilus* ACA-DC 0040, en cultivo por lote, usando caldo Elliker modificado, a 37 °C y pH controlado en 6.2. Tomado de (Aktypis et al., 2007).

De forma similar, Todorov y colaboradores (Todorov et al., 2011) estudiaron la producción de bacteriocinas por *Lactobacillus sakei* R1333 aislado de salmón ahumado, en fermentador de 2 L de MRS, a 30 °C, agitación a 100 rpm y control de pH a 6.5, usando como indicador a *Listeria innocua* F, encontrando un máximo en la actividad antimicrobiana, entre 800 y 1,600 UA/mL, entre las 5 y 12 horas del cultivo, para disminuir de forma importante hasta el final de los procesos (Figura 15).

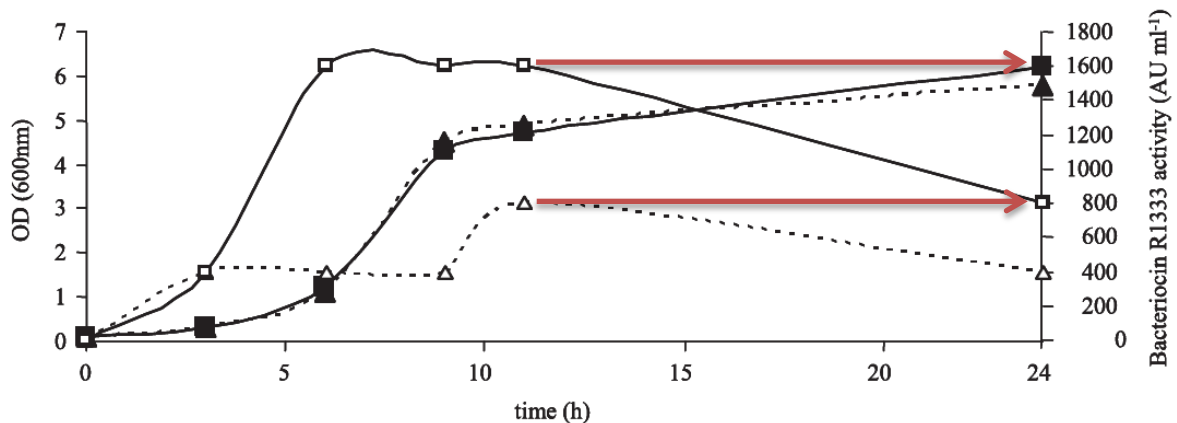


Figura 15. Producción de bacteriocina R1333 (AU/mL) por *L. sakei* R1333 creciendo en MRS con (□) y sin (△) Tween 80. Tomado de (Todorov et al., 2011).

En otro trabajo donde se reportan investigaciones con distintos medios de cultivo, entre ellos melazas del 2 al 10% p/v, en fermentaciones a 30 °C sin agitación, se lograron actividades de bacteriocina muy modestas (200 UA/mL) con la BAL, *Lactobacillus plantarum* ST13BR (Todorov, Van Reenen, & Dicks, 2004). Estas actividades antimicrobianas equivalen solo al $(200/8,624) \times 100 = 2.3\%$ de la máxima reportada en el presente trabajo al crecer a la BAL1 en medio MMP que contiene 4% p/v melaza.

9.3.1 Efecto de la proteinasa K sobre la actividad antimicrobiana

Con el fin de determinar la naturaleza proteica de los CAM producidos por la BAL1, el sobrenadante concentrado libre de biomasa fue sometido a un tratamiento con una solución de proteinasa K (1 mg/mL) e incubación a 37 °C por 1 h, obteniéndose como resultado una pérdida total de la AaM (Figura 16). En trabajos relacionados se ha reportado la inactivación de diversas bacteriocinas producidas por bacterias del genero *Streptococcus* después la digestión con proteinasa K como el caso de una bacteriocina producida por *S. thermophilus* 81 (Ivanova et al., 1998), termofilina 1277 producida por *S. thermophilus* 1277 (Kabuki, Uenishi, Watanabe, Seto, & Nakajima, 2006), bovicina HJ50 producida por *S. bovis* HJ50 (Xiao, 2004) y salivaricina 9 producida por *S. salivarius* NU10 (Barbour, Philip, & Muniandy, 2013) por mencionar algunas. La obtención de estos resultados sugiere firmemente que la naturaleza bioquímica de los CAM producidos por la BAL1 corresponde a péptidos antimicrobianos tipo bacteriocinas.

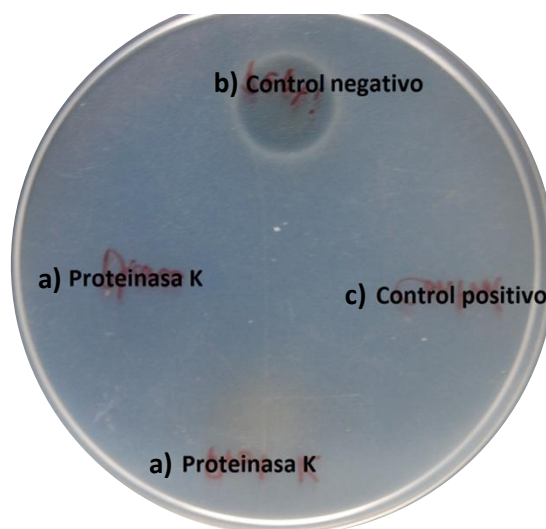
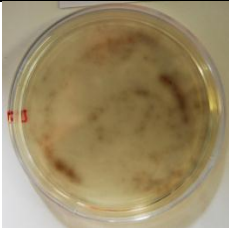
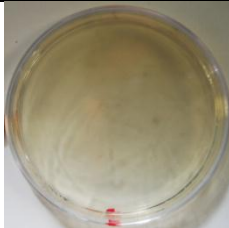
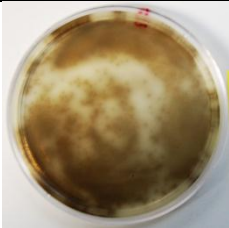
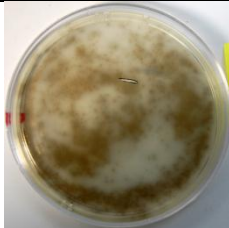
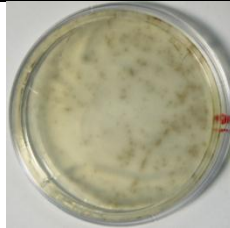

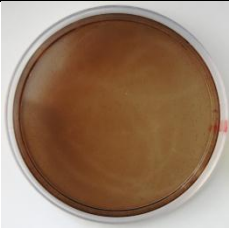
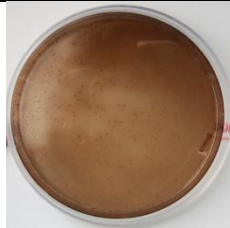
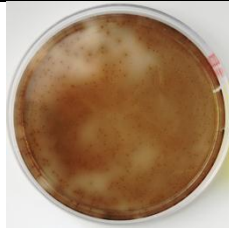



Figura 16. Efecto del tratamiento con proteinasa K (1 mg/mL) sobre la actividad antimicrobiana de CAM contra *L. monocytogenes*. a) Pérdida de actividad antimicrobiana por efecto de digestión con proteinasa K; b) Control negativo (sobrenadante concentrado sin tratamiento con proteinasa K; c) Control positivo (proteinasa K, 1 mg/mL + agua).

9.3.2 Concentración mínima inhibitoria

Se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) con el fin de conocer la concentración mínima (UA/mL) a la que los CAM son capaces de inhibir el crecimiento visible de *Lm*. Las concentraciones evaluadas fueron 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 UA/mL. El blanco, así como la caja correspondiente a 2.5 UA/mL presentaron crecimiento visible de *Lm* (colonias pequeñas de color grisáceo con halo negro, característico del crecimiento de *Lm* en agar Oxford) desde las 16 h de incubación a 35 °C, mientras que el tratamiento con 5 UA/mL mostró un ligero crecimiento a partir de las 20 h. Referente a las concentraciones correspondientes a 10, 20, 40 y 80 UA/mL los resultados pueden apreciarse en el Cuadro 8, destacando el tratamiento con 20 UA/mL que logró inhibir a *Lm* por 24 h, motivo por el cual se seleccionó dicha concentración como la mínima inhibitoria. Por otro lado es importante señalar que con 80 UA/mL, el desarrollo de *Lm* fue inhibido hasta por 48 h. Millette y colaboradores (Millette et al., 2008) en un trabajo similar pero con *Pediococcus acidilactici* MM33, reportaron una CMI de 200 UA/mL contra *L. monocytogenes* mientras que Kaur y colaboradores (Kaur et al., 2013) mencionan una CMI para pediocina 34, de 540 UA/mL contra *L. monocytogenes* ATCC 53135 inhibiéndola por 18 h. De los resultados mencionados anteriormente, se puede sugerir que los CAM producidas por la BAL1 cuentan con una alta eficacia para inhibir el crecimiento del patógeno *Lm* lo cual es de gran interés por el potencial que esto conlleva en la industria de aditivos naturales.

Cuadro 8. Cinética de crecimiento de *L. monocytogenes* en agar Oxford, en contacto con sobrenadante concentrado libre de biomasa (MRS, t=6 h) producido por BAL1 a diferentes concentraciones.

Tiempo (h)	Blanco	UA/mL				
		5	10	20	40	80
20			SC	SC	SC	SC
24				SC	SC	SC
48						SC

(SC) Sin crecimiento visible.

9.4 Purificación de compuestos antimicrobianos

La purificación de los CAM producidos por la BAL1, crecida en medio MRS, se hizo siguiendo un método de tres pasos. El primero paso consistió en una doble precipitación, iniciando con sulfato de amonio a 50% y posteriormente con 4 volúmenes de acetona fría (-20 °C), mediante esta etapa se obtuvo la Fracción denominada Ib. En el segundo paso, la Fracción Ib fue sometida a una cromatografía de filtración en gel empleando una resina Bio-Gel® P30 con un tamaño de exclusión de 2,500 - 40,000 MW, en esta etapa se obtuvieron cerca de 18 fracciones, a las cuales se les evaluó la AaM mediante el método de difusión en agar, solo aquellas que exhibieron actividad contra *Lm* se reunieron en una sola obteniendo la fracción indicada como IIb. En el último paso se realizó una cromatografía RP-HPLC, mediante la cual se obtuvieron dos picos (Fracciones A y B) a una absorbancia de 230 nm (Figura 17), fueron colectados y evaluados por el método de difusión en agar contra *Lm*. Solo la fracción correspondiente al pico B con un tiempo de retención de 2.080 min presentó actividad antilisterial; esta fracción se nombró Fracción IIIb.

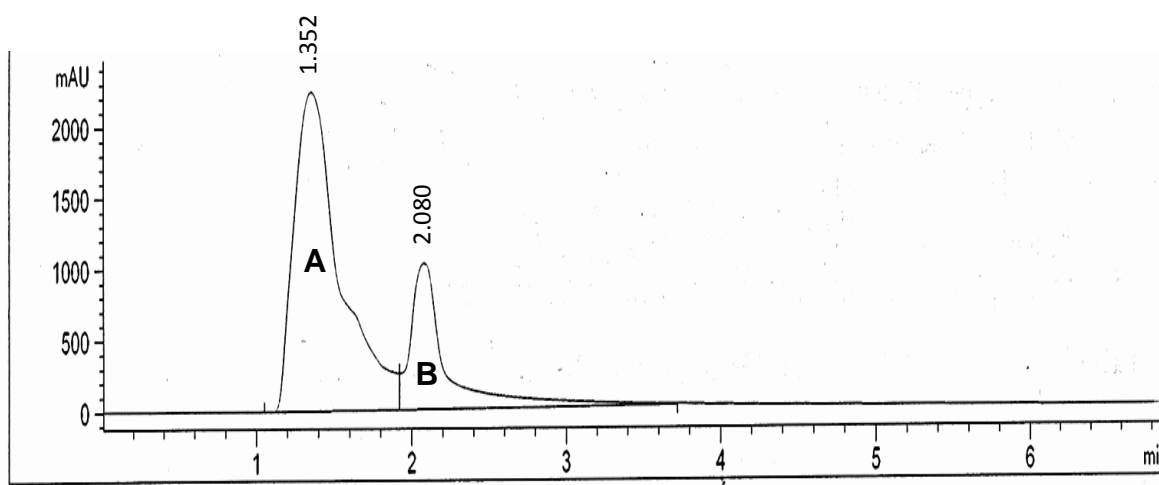


Figura 17. Cromatograma RP-HPLC de Fracción IIb en una columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4.6 × 50 mm × 2.7 μm), eluida mediante solución A (30% acetonitrilo / 0.1% TFA) y B (agua destilada / 0.1% TFA) con un flujo de 0.5 mL/min.

Como referencia para establecer un punto de comparación, se utilizó una Pediocina (bacteriocina de clase IIa) comercial que fue inyectada al HPLC bajo las mismas condiciones que la Fracción IIb, obteniéndose un espectro similar al conseguido por los CAM de la BAL1, dicho espectro puede apreciarse en la Figura18, en él se exhiben dos picos principales donde de manera análoga la fracción del pico B fue aquella que mostro actividad contra *Lm* pero con un tiempo de retención de 1.800 min.

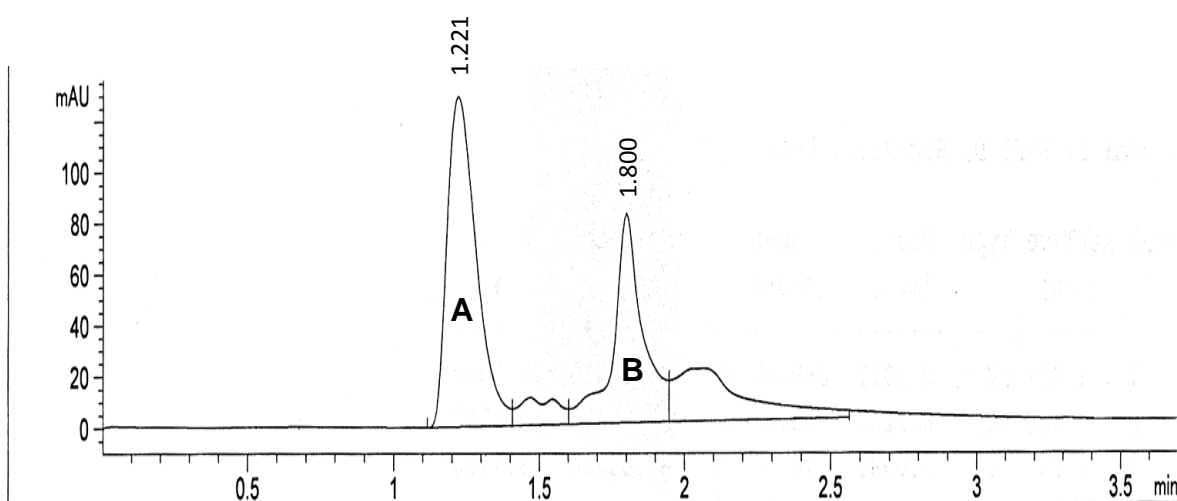


Figura 18. Cromatograma RP-HPLC de Pediocina (Sigma Aldrich®) en una columna Agilent Zorbax 300 SB-C18 (4.6 × 50 mm × 2.7 μm), eluida mediante solución A (30% acetonitrilo / 0.1% TFA) y B (agua destilada / 0.1% TFA) con un flujo de 0.5 mL/min.

En la literatura no existen reportes para la producción de bacteriocinas por parte de *Streptococcus infantarius*, sin embargo en un trabajo similar reportado por Arul (2009), se encontró un tiempo de retención de 12.94 min para focaecina PI80 -una bacteriocina producida por *Streptococcus phocae* PI80- usando una columna C18 (Luna 5 μm, 4.6 × 250 mm; Phenomenex, CA, U.S.A.), elución con 90% de una solución A (0.1% p/v TFA en 5% v/v acetonitrilo y agua) y 10% de una solución B (0.1% TFA in 100% acetonitrilo), un flujo de 1mL/min y detección a 220 nm, lo cual representa $(12.94/2.080)=6.2$ veces el tiempo obtenido en el presente trabajo.

Por otro lado, en SDS-PAGE la Fracción Ib exhibió una banda, ubicando el peso molecular (PM) de los CAM cerca de 9 kDa en comparación con 4.9 kDa obtenidos por el estándar de pediocina, ambas bandas mostraron actividad contra *Lm* (Figura 19).

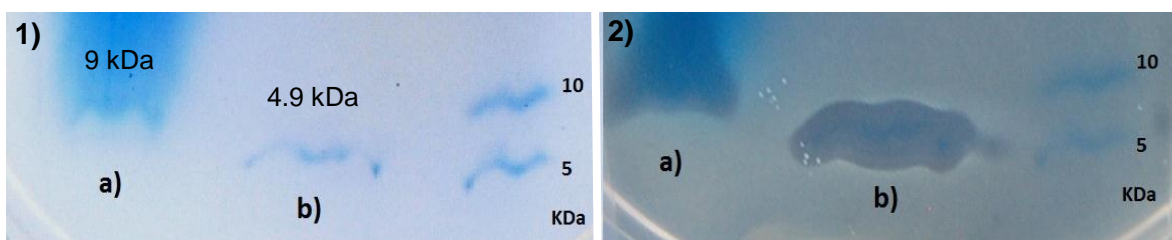


Figura 19. Electroforesis SDS-PAGE: 1) Gel 13-16% teñido con azul de Coomassie donde a) Fracción Ib; b) pediocina Sigma Aldrich®; 2) Zonas de inhibición de *Listeria monocytogenes* en gel correspondientes a Fracción Ib (a) y pediocina Sigma Aldrich® (b).

Diversas bacteriocinas producidas por BAL del género *Streptococcus* han sido reportadas en la literatura, no obstante el rango de PM encontrados es muy diverso, Balakrishnan y colaboradores (Balakrishnan, Simmons, Carne, & Tagg, 2000), reportaron un PM de 4.806 kDa para mutacina N producida por *S. mutans* N, por su parte Wang y colaboradores (Wang et al., 2014) reportaron 3.428 kDa para bovicina HJ50 producida por *S. bovis* HJ50, mientras que Arul (Arul, 2009) menciona un PM de 9.24 kDa para focaecina PI80 producida por *S. phocae* PI80, ésta última de PM muy similar al evidenciado por los CAM producidos por la BAL1 (*S. infantarius*). De manera similar se han reportado PM mucho mayores a los ya mencionados, por ejemplo dysgalactina aislada de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* tiene un PM de 21 kDa, Stellacina 29 kDa y SA-M57 17 kDa producidas por *S. constellatus* subsp. *constellatus* y *S. pyogenes* M tipo 57, respectivamente (Mouloud, Daoud, Bassem, Laribi Atef, & Hani, 2013).

Por otro parte, la Fracción IIb obtenida mediante cromatografía de filtración en gel mostró una banda muy tenue, sin embargo, más limpia en comparación con la Fracción Ib mientras que el extracto correspondiente a la Fracción IIIb (RP-HPLC) presentó una banda prácticamente limpia (Figura 20-2). Las bandas mostradas por

las tres fracciones evaluadas, presentaron actividad contra *Lm* (Figura 20-3). El hecho de visualizar una banda libre de restos del medio de producción u otros contaminantes sugiere que el método de tres pasos propuesto en el presente trabajo, representa una opción viable para la purificación de los CAM producidos por la BAL1, lo cual es de fundamental para lograr su secuenciación.

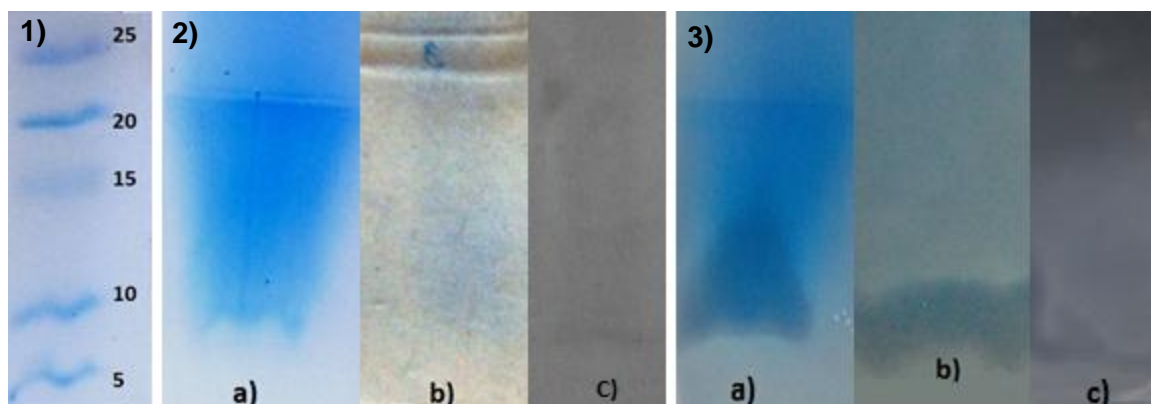


Figura 20. Purificación de CAM producidos por la BAL 1 (*Streptococcus infantarius*) mediante método de tres pasos: 1) Marcador molecular (Biorad®). 2) Gel 13-16% (a y b), gel 16.5% (c) teñido con azul de Coomassie donde a) Precipitación doble con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y acetona (Fracción Ib); b) Cromatografía de filtración en gel (Fracción IIb); c) RP-HPLC (Fracción IIIb). 3) Zonas de inhibición de *Listeria monocytogenes* en gel correspondientes a fracción Ib, IIb y IIIb.

Algunas de las características de las bacteriocinas de la clase IIa son un PM menor de 10 kDa y gran actividad antilisteria (Drider, Fimland, Hechard, McMullen, & Prevost, 2006), por tanto, basándonos en los resultados obtenidos podríamos sugerir que los CAM aislados de *S. infantarius* podría tratarse de una bacteriocina de este tipo.

10. CONCLUSIONES

La bacteria ácido láctica, *Streptococcus infantarius*, aislada del pozol, una bebida fermentada tradicional mexicana, produce una actividad antilisterial sobresaliente creciendo en un medio económico que incorpora melaza (subproducto de la industria azucarera), presentándose como una alternativa viable para la eventual sustitución de medios comerciales (MRS, M17) que incrementan los costos de producción, especialmente en producciones de mayor escala. Por otra parte, con base en los estudios de electroforesis de las fracciones obtenidas a partir del caldo de fermentación de la BAL1, así como la exhibición de actividad antilisterial, termoresistencia (110 °C/10 min) y naturaleza proteínica, los CAM producidos podrían ser de naturaleza bacteriocina tipo IIa. El método de purificación de tres pasos propuesto en el presente trabajo, podría representar una opción viable para la purificación de los CAM producidos por *Streptococcus infantarius*.

11. RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

- Optimizar el medio MMP para la producción de compuestos antimicrobianos por BAL1.
- Explorar otras condiciones de fermentación en biorreactor para la producción de compuestos antimicrobianos por BAL1 usando el medio MMP optimizado.
- Caracterizar los efectos de la temperatura, pH y tiempo de almacenamiento sobre la actividad antimicrobiana producida.
- Realizar la secuenciación los compuestos antimicrobianos obtenidos.
- Evaluar el peso molecular de los compuestos antimicrobianos por un método más preciso, como espectrofotometría de masas (MALDI-TOF).
- Valorar la microscopia electrónica de barrido como método para visualizar el efecto de los compuestos antimicrobianos sobre la membrana plasmática de *Listeria monocytogenes*, en principio.

12. ANEXOS

ANEXO I

DIFUSIÓN EN AGAR POR GOTA

- Formulación del agar BHI suave

Reactivo	Cantidad
Caldo BHI	1.5 g
Agar	0.8 g
Agua destilada estéril	100 mL

- Prueba de gota (Dilución crítica)

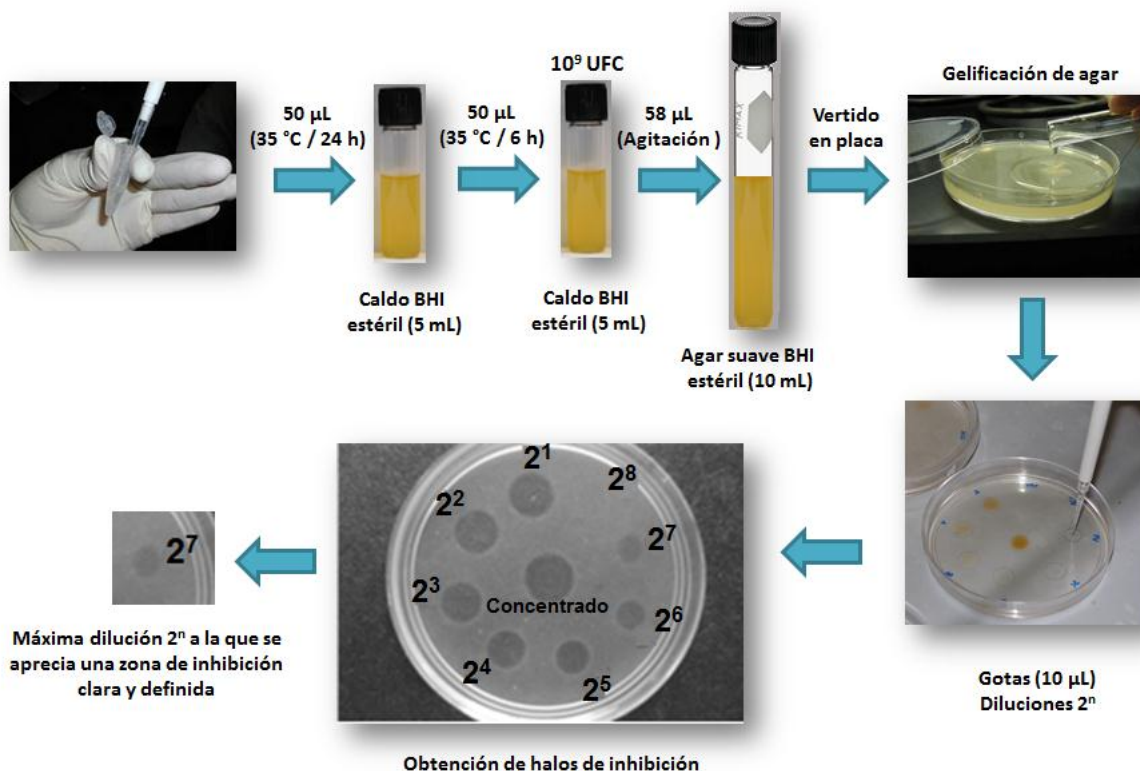


Figura A.1. Metodología para la prueba de difusión en agar

ANEXO II

PREPARACIÓN DE BUFFER DE FOSFATOS

- **Solución A:**

Fosfato de sodio monobásico monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 0.2 M

Pesar 27.6 g y colocarlos en un matraz aforado de 1 L, disolver con agua destilada y aforar.

- **Solución B:**

Fosfato de sodio dibásico heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 0.2 M

Pesar 53.65 g y colocarlos en un matraz aforado de 1 L, disolver con agua destilada y aforar.

pH	Sol. A (mL)	Sol. B (mL)	Agua destilada (mL)
6	438.5	61.5	
6.1	425	75	
6.2	407.5	92.5	500
6.3	387.5	112.5	
6.4	367.5	132.5	
6.5	342.5	157.5	

La molaridad obtenida será de 0.1, omitir adición de agua para obtener una solución 0.2 M.

ANEXO III

SOLUCIONES PARA ELECTROFORESIS SDS-PAGE

- **Acrilamida 29% / Bisacrilamida 1%**

La acrilamida monomérica es neurotóxica, se debe usar guantes y mascarilla para su manipulación. En un volumen de 100 mL de agua desionizada mezclar hasta disolver 29 g de acrilamida y 1 g de N,N'-metilen-bis-acrilamida. Filtrar con membrana de 0.22 µm. Almacenar a 4 °C.

- **Tris-HCl, 8x, pH 8.8**

Disolver 6.05 g de Tris base en 40 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 6.8 con HCl 1 N y aforar a 100 mL. Almacenar a 4 °C.

- **Tris-HCl, 4x, pH 6.8**

Pesar 182 g de Tris base y disolver en 300 mL de agua desionizada, ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N y aforar a 500 mL. Almacenar a 4 °C.

- **Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%**

Pesar 1 g de SDS y disolver en 10 mL de agua desionizada. Almacenar a 4 °C.

- **Persulfato de amonio al 10%**

Disolver 0.1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua desionizada. Almacenar a 4 °C.

- **Solución de tinción Azul de Coomassie**

Mezclar 50% de metanol, 10% de ácido acético, 40% de agua destilada, 0.05% (p/v) azul de Coomassie. Ajustar cantidades a utilizar. Esta solución se puede almacenar a temperatura ambiente hasta por un mes.

- **Solución desteñidora**

Mezclar 45% v/v metanol, 10% v/v ácido acético, 45% v/v agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Buffer de corrida 5x (Tris-Glicina)**

Disolver 72 g de glicina, 15.1 g de Tris base, 5 g de SDS en agua desionizada y aforar a 1000 mL sin ajustar pH. Para preparar la solución de corrida 1x (SDS 0.1% en Tris -Glicina pH 8.3) diluir 1:5 la solución 5x. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Buffer de muestra**

Disolver 1.2 g de SDS, 0.93 g de ditioneitol (DTT), 6 mg de azul de bromofenol, 3.75 mL de buffer Tris-HCl pH 6.8, 6 mL de glicerol y ajustar hasta 10 mL. Distribuir en tubos Eppendorf® de 1 mL y guardar a -20 °C.

- Preparación de geles de poliacrilamida

Gel separador 0.375 M Tris, pH 8.8			
	13%	16%	16.5%
Agua desionizada	3.1 mL	2.1 mL	2.17 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	2.5 mL	2.5 mL	2.5 mL
10% (p/v) SDS	50 µL	50 µL	50 µL
Acrilamida / Bisacrilamida (29% / 1% p/v)	4.3 mL	5.3 mL	5.47 mL
10% p/v persulfato de sodio	50 µL	50 µL	50 µL
TEMED	5 µL	5 µL	5 µL
Volumen total	10.005 mL	10.005 mL	10.005 mL

Gel concentrador 0.125 M Tris, pH 8.8	
	4%
Agua desionizada	3.075 mL
1.5 M Tris-HCl, pH 8.8	1.25 mL
10% (p/v) SDS	25 µL
Acrilamida / Bisacrilamida (29% / 1% p/v)	0.67 mL
10% p/v persulfato de sodio	25 µL
TEMED	5 µL
Volumen total	5.05 mL

ANEXO IV

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA EN GELES DE POLIACRILAMIDA

- Formulación del agar BHI

Reactivo	Cantidad
Caldo BHI	3.6 g
Agar	1.7 g
Agua destilada estéril	100 mL

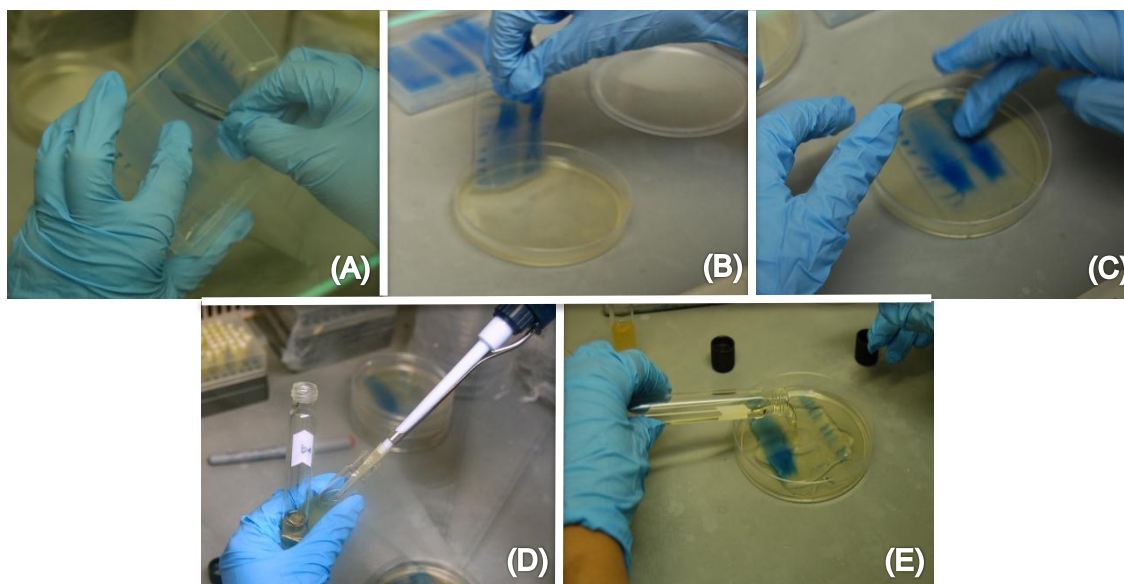


Figura A.2. Evaluación de actividad antimicrobiana en geles de poliacrilamida: (A) Corte del gel; (B) Preparación de cama con agar BHI placa; (C) Colocación de gel sobre cama de agar BHI placa; (D) Inoculación de agar BHI suave con *Listeria monocytogenes* (10^9 UFC); (E) Cobertura de gel con agar BHI suave.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Aktypis, A., Tychowski, M., Kalantzopoulos, G., & Aggelis, G. (2007). Studies on bacteriocin (thermophilin T) production by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040 in batch and fed-batch fermentation modes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 92(2), 207-220.
- Alquicira-López, L. (2006). *Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina prodicida por Pediococcus parvulus MXVK 133*. Tesis de Maestría, Universidad Autonoma Metropolitana, D.F., México.
- Andrews, J. M. (2001). Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 5-16.
- Arauz, L. J., Jozala, A. F., Baruque-Ramos, J., Mazzola, P. G., Pessoa, A., & Penna, T. C. V. (2011). Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology*, 62(1), 419-426.
- Arul, V. (2009). Purification and characterization of Phocaecin PI80: An anti-listerial bacteriocin produced by *Streptococcus phocae* PI80 isolated from the gut of *Peneaus indicus* (Indian white shrimp). *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(11), 10393-11400.
- Balakrishnan, M., Simmons, R. S., Carne, A., & Tagg, J. R. (2000). *Streptococcus mutans* strain N produces a novel low molecular mass non-lantibiotic bacteriocin. *FEMS Microbiology Letters*, 183, 165-169.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. d. M., Converti, A., & Oliveira, R. P. d. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142.
- Barbour, A., Philip, K., & Muniandy, S. (2013). Enhanced production, purification, characterization and mechanism of action of salivaricin 9 lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius* NU10. *PLoS One*, 8(10), 1-16.
- Belguesmia, Y., Choiset, Y., Prevost, H., Dalgalarondo, M., Chobert, J. M., & Drider, D. (2010). Partial purification and characterization of the mode of

- action of enterocin S37: a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* S37 isolated from poultry feces. *Journal of Environmental and Public Health*, 2010, 1-8.
- Benmechernene, Z., Fernández, I., Kihal, M., Böhme, K., Calo-Mata, P., & Barros-Velázquez, J. (2013). Recent patents on bacteriocins: Food and biomedical applications. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences*, 7, 66-73.
- Bhunja, A., Johnson, M. C., & Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology*, 2(5), 319-322.
- Botina, A. B., Zimmermann, B. H., & Vanega, L. M. (2008). Caracterización preliminar de compuestos antilisteriales producidos por bacterias ácido lácticas nativas. *Revista MVZ Córdoba*, 13(3), 1476-1485.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238-250.
- Carolissen-Mackay, V., Arendse, G., & Hastings, J. W. (1997). Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. *International Journal of Food Microbiology*, 34(1-16).
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20.
- Chen, H., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their Food Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2, 82-100.
- De Arauz, L. J., Jozala, A. F., Mazzola, P. G., & Vessoni Penna, T. C. (2009). Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20(3-4), 146-154.
- De Vuyst, L., Callewaert, R., & Crabbé, K. (1996). Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactococcus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavourable growth conditions. *Microbiology*, 142(4), 817-827.

- De Vuyst, L., & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 13(4), 194-199.
- De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1992). Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. *Journal of General Microbiology*, 138, 571-578.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, P. (2006). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. *International Dairy Journal*, 16(9), 1058-1071.
- Dicks, L. M., Mellett, F. D., & Hoffman, L. C. (2004). Use of bacteriocin-producing starter cultures of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus* in production of ostrich meat salami. *Meat Science*, 66(3), 703-708.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., & Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(2), 564-582.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J., & Gokhale, D. (2007). Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* Mutant Uc-3 in Batch Fermentation. *Applied and environmental microbiology*, 74(1), 333-335.
- Eddy, B. P. (1961). The Voges-Proskauer reaction and its significance: A review. *Journal of Applied Bacteriology*, 24(1), 27-41.
- Fajardo-Castillo, E. E., & Sarmiento-Forero, S. C. (2007). *Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Profesional, Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- FinancieraRural. (2011). Monografía de la melaza de caña de azúcar Retrieved 14 Marzo, 2013, from [http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMelaza\(sept11\).pdf](http://www.financierarural.gob.mx/informacionsectorrural/Documents/Monografias/Monograf%C3%ADaMelaza(sept11).pdf)
- Fujita, K., Ichimasa, S., Zendo, T., Koga, S., Yoneyama, F., Nakayama, J., & Sonomoto, K. (2007). Structural analysis and characterization of lacticin Q,

- a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(9), 2871-2877.
- Galvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., & Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Internacional Journal of Food Microbiology*, 120(1-2), 51-70.
- Grande, M. J., Lucas, R., Valdivia, E., Abriouel, H., Maqueda, M., BenOmar, N., . . . Gálvez, A. (2005). Stability of Enterocin AS-48 in fruit and vegetable juices. *Journal of Food Protection*, 68(10), 2085-2094.
- Héchar, Y., & Sahl, H.-G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84, 545-557.
- Hequet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C., Fremaux, C., & Berjeaud, J. M. (2007). Characterization of new bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated using a medium designed to simulate inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on meat. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1), 67-74.
- Hirsch, A. (1951). Growth and Nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology*, 5, 208-221.
- Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., . . . Boyaval, P. (1998). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. *International Journal of Food Microbiology*, 42, 147-158.
- Iverson, W. G., & Millis, N. F. (1976). Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 22(7), 1040-1047.
- Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P. M., Lacroix, C., & Meile, L. (2012). Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology*, 31(1), 33-42.
- Jones, E., Salin, V., & Williams, G. W. (2005). Nisin and the market for commercial bacteriocins. In C. a. P. R. R. N. CP-01-05 (Ed.).

- Kabuki, T., Uenishi, H., Watanabe, M., Seto, Y., & Nakajima, H. (2006). Characterization of a bacteriocin, Thermophilin 1277, produced by *Streptococcus thermophilus* SBT1277. *Journal of Applied Microbiology*, 102(2007), 971-980.
- Kaur, G., Singh, T. P., & Malik, R. R. (2013). Antibacterial efficacy of Nisin, Pediocin 34 and Enterocin FH99 against *Listeria monocytogenes* and cross resistance of its bacteriocin resistant variants to common food preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, 44(1), 63-71.
- 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*. Maestría en Ciencia de los Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, México.
- Lucas-López, R., García, M. T., Abriouel, H., Ben Omar, N., Grande, M. J., Martínez-Cañamero, M., & Gálvez, A. (2007). Semi-preparative scale purification of enterococcal bacteriocin enterocin EJ97, and evaluation of substrates for its production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34, 779-785.
- Mantovani, H. C., Kam, D. K., Ha, J. K., & Russell, J. B. (2001). The antibacterial activity and sensitivity of *Streptococcus bovis* strains isolated from the rumen of cattle. *FEMS Microbiology Ecology*, 37, 223,229.
- Maragkoudakis, P. A., Papadelli, M., Georgalaki, M., Panayotopoulou, E. G., Martinez-Gonzalez, B., Mentis, A. F., . . . Tsakalidou, E. (2009). In vitro and in vivo safety evaluation of the bacteriocin producer *Streptococcus macedonicus* ACA-DC 198. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 141-147.
- Martínez-Cuesta, M. C., Bengoechea, J., Bustos, I., Rodríguez, B., Requena, T., & Peláez, C. (2010). Control of late blowing in cheese by adding lacticin 3147-producing *Lactococcus lactis* IFPL 3593 to the starter. *International Dairy Journal*, 20(1), 18-24.

- Martínez-Fernández, B. (1996). *Bacteriocinas de Lactococcus lactis* aislados de quesos asturianos: Nisina Z y Lactococina 972. Tesis de Doctorado, Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- 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*. Maestría en Ciencia de los Alimentos, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo de Bravo, Hidalgo. México.
- Mendoza-Mendoza, B., Montiel, R., Rodríguez-Hernández, A.-I., Ramos-Aboites, H.-E., Vargas-Torres, A., Castro-Rosas, J., . . . Chavarría-Hernández, N. (2013). Characterization of the effects on the growth kinetics of *Listeria monocytogenes* in solid culture in contact with caseinate base edible films added with antilisterial activity from *Streptococcus* sp. ABMX isolated from Pozol, an indigenous Mexican beverage. *International Food Research Journal*, 20(5), 2917-2925.
- Messaoudi, S., Kergourlay, G., Dalgarrondo, M., Choiset, Y., Ferchichi, M., Prevost, H., . . . Dousset, X. (2012). Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food Microbiology*, 32(1), 129-134.
- Metsoviti, M., Paramithiotis, S., Drosinos, E. H., Skandamis, P. N., Galiotou-Panayotou, M., & Papanikolaou, S. (2011). Biotechnological valorization of low-cost sugar-based media for bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131. *New Biotechnology*, 28(6), 600-609.
- Meziane, M. (2011). Lactic acid and hydrogen peroxide production by free and immobilization cells of two *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in a sugar molasses medium. *African Journal of Biotechnology*, 10(74).
- Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., . . . Cao, Y. (2014). Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. *Food Control*, 42, 48-53.

- Millette, M., Dupont, C., Shareck, F., Ruiz, M. T., Archambault, D., & Lacroix, M. (2008). Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain. *Journal of Applied Microbiology*, 104(1), 269-275.
- Mouloud, G., Daoud, H., Bassem, J., Laribi Atef, I., & Hani, B. (2013). New bacteriocin from *Bacillus clausii* strain GM17: Purification, characterization, and biological activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(8), 2186-2200.
- Núñez, M., Tomillo, J., Gaya, P., & Medina, M. (1996). Bacteriocin quantification by the critical dilution method: a comparison of arbitrary units with diameter and area of the zone of growth inhibition. *Milchwissenschaft*, 5(1), 7-10.
- Oscariz, J. C., & Pisabarro, A. G. (2001). Classification and mode of action of membrane-active bacteriocins produced by gram- positive bacteria. *International Microbiology*, 4, 13-19.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnology Advances*, 21(6), 465-499.
- Papagianni, M., & Anastasiadou, S. (2009). Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*. Sources, production, properties and applications. *Microbial Cell Factories*, 8(1), 3.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., & Socol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50(3), 521-542.
- Parente, E., & Ricciardi, A. (1999). Production, recovery and purification of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52(5), 628-638.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., & Klein, D. A. (2002). *Microbiology* (5th ed.): The McGraw-Hill.

- Rodríguez-Rodríguez, A., & Cruz-Maldonado, J.-J. (2011). Bioingeniería de fermentaciones para la producción de biológicos de valor. Reporte de Servicio Social Profesional.: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
- Romero-Hernández, B., del Campo, R., & Cantón, R. (2013). *Streptococcus bovis*, situación taxonómica, relevancia clínica y sensibilidad antimicrobiana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31, 14-19.
- Ross, P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 79(1-2), 3-16.
- Saavedra, L., & Sesma, F. (2011). Purification techniques of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria and other Gram-Positive bacteria. In D. Drider & S. Rebuffat (Eds.), *Prokaryotic Antimicrobial Peptides* (pp. 99-113). New York: Springer
- Sánchez-Valenzuela, A., Díaz-Ruiz, G., Omar, N. B., Abriouel, H., Lucas-López, R., Martínez-Cañamero, M., . . . Gálvez, A. (2008). Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. *Food Control*, 19(9), 842-848.
- Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N., & Traore, S. A. (2006). Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria - A minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5(9), 678-683.
- Schlegel, L., Grimont, F., Collins, M. D., Régnault, B., Grimont, P., & Bouvet, A. (2000). *Streptococcus infantarius* sp. nov., *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* subsp. nov., and *Streptococcus infantarius* subsp. *coli* subsp. nov., isolated from humans and food. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1425-1434.
- Schlegel, L., Grimont, F., Grimont, P. A., & Bouvet, A. (2004). New group D streptococcal species. *Indian Journal of Medical Research*, 119, 252-256.
- Sparo, M., Nunez, G. G., Castro, M., Calcagno, M. L., Garcia Allende, M. A., Ceci, M., . . . Manghi, M. (2008). Characteristics of an environmental strain,

- Enterococcus faecalis* CECT7121, and its effects as additive on craft dry-fermented sausages. *Food Microbiology*, 25(4), 607-615.
- Strömstedt, A. A., Ringstad, L., Schmidtchen, A., & Malmsten, M. (2010). Interaction between amphiphilic peptides and phospholipid membranes. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15(6), 467-478.
- Tavera-Montes, F. L. (2010). *Producción de bacteriocinas a partir de bacterias ácido lácticas aisladas de pozol para la inhibición de bacterias patógenas*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F., México.
- Todorov, S. D. (2008). Bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from amasi, a Zimbabwean fermented milk product and study of adsorption of bacteriocin AMA-K to *Listeria* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39, 178-187.
- Todorov, S. D., & Dicks, L. M. T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38, 166-172
- Todorov, S. D., Rachman, C., Fourrier, A., Dicks, L. M., van Reenen, C. A., Prevost, H., & Dousset, X. (2011). Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* R1333 isolated from smoked salmon. *Anaerobe*, 17(1), 23-31.
- Todorov, S. D., Van Reenen, C. A., & Dicks, L. M. T. (2004). Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 50, 149-157.
- Trinetta, V., Rollini, M., & Manzoni, M. (2008). Development of a low cost culture medium for sakacin A production by *L. sakei*. *Process Biochemistry*, 43(11), 1275-1280.
- Ugras, S. (2013). Purification and characterization of the bacteriocin Thuricin Bn1 produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* Bn1 isolated from a Hazelnut Pest. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 167-176.

- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic Acid Bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews*, 12, 221-238.
- Vera Pingitore, E., Salvucci, E., Sesma, F., & Nader-Macías, M. (2007). Different strategies for purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 1, 557-568.
- Wang, J., Ma, H., Ge, X., Zhang, J., Teng, K., Sun, Z., & Zhong, J. (2014). Bovicin HJ50-like lantibiotics, a novel subgroup of lantibiotics featured by an indispensable disulfide bridge. *PLoS One*, 9(5), 1-11.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., & Ryu, H.-W. (2004). Utilization of sugar molasses for economical L(+)-lactic acid production by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 35(6-7), 568-573.
- Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
- Wolf-Hall, C. E., Gibbons, W. R., & Bauer, N. A. (2009). Development of a low-cost medium for production of nisin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(11), 2013-2019.
- Wu, C.-W., Yin, L.-J., & Jiang, S.-T. (2004). Purification and characterization of bacteriocin from *Pediococcus pentosaceus* ACCEL. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(5), 1146-1151.
- Xiao, H. (2004). Bovicin HJ50, a novel lantibiotic produced by *Streptococcus bovis* HJ50. *Microbiology*, 150(1), 103-108.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kawai, Y., Inoue, N., & Montville, T. J. (2005). Purification and characterization of a novel class IIa bacteriocin, piscicocin CS526, from surimi-associated *Carnobacterium piscicola* CS526. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), 554-557.

- Yang, R., Johnson, M. C., & Ray, B. (1992). Novel method to extract large amounts of bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(10), 3355-3359.
- Yann, H., & Hans-Georg, S. (2001). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie*, 84, 545-557.
- Zacharof, M. P., & Lovitt, R. W. (2012). Bacteriocins produced by Lactic Acid Bacteria a review article. *APCBEE Procedia*, 2, 50-56.
- Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterisation of plantaricin ZJ008, a novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. from *Lactobacillus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry*, 165, 216-223.