



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**

---

---

**Instituto de Ciencias Agropecuarias**

**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**

**T E S I S**

**Que para obtener el grado de:**

**MAESTRA EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

**Ing. En Alimentos Mayra Alejandra López Ortega**

**Dirección: Dr. Norberto Chavarría Hernández, UAEH**

**Co-Dirección: Dra. Adriana Inés Rodríguez Hernández, UAEH**

**Tulancingo de Bravo, Hgo., Noviembre, 2014**

## AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, institución que me ha formado y que me brindó la oportunidad de realizar mis estudios de licenciatura y posgrado. Al Centro de Investigaciones en Ciencia y Tecnología de los Alimentos UAEH-ICAp donde realicé el trabajo experimental para este trabajo de investigación.

Se agradece la beca CONACYT para realización de estudios de posgrado. Así como al financiamiento al proyecto "Diseño y caracterización de películas alimentarias a base de biopolímeros y antimicrobianos naturales" que se realiza en el marco de la red "Biotecnologías basadas en biomoléculas funcionales para el sector agroalimentario" financiado por el programa de Mejoramiento del Profesorado, SEP, 2012.

A mi director de tesis, Dr. Norberto Chavarría Hernández, mi más sincero y amplio agradecimiento por haber confiado en mí para este trabajo, por su infinita paciencia ante mi lentitud y falta de constancia. Por su valiosa dirección, su visión crítica y rectitud, además su entrega a ésta tesis y por sus valiosos consejos que permitieron concluirlo. Por ser tan buena persona conmigo y todo el grupo de trabajo que lidera. A mi co-directora, Dra. Adriana I. Rodríguez Hernández, por sus consejos, gran sabiduría, paciencia, apoyo y ánimo que me brindó durante todos estos años. Gracias por permitirme aprovechar su competencia y su experiencia para bien. Agradezco por haberme mostrado una sincera amistad y su calidez humana. Mi más sincera gratitud para ustedes dos, y gracias por permitirme convivir con ustedes y su linda familia.

Agradezco mi asesora, Dra. Gloria Díaz Ruíz (UNAM) por su tiempo y por siempre mantener las puertas abiertas para las necesidades que surgieron durante el desarrollo de ésta tesis. También quiero darle las gracias por el aporte tan valioso a esta tesis y por sus importantes y siempre bien recibidas observaciones, para enriquecerla.

A mi asesor, Dr. Javier Piloni Martini, por su tiempo, consejos y facilidades que me ha aportado para nutrir siempre esta investigación, por haberme permitido aprender de su amplia experiencia y todas las facilidades recibidas.

Finalmente quiero agradecer a todos los profesores que directa e indirectamente han participado en esta tesis y que también han formado parte de mi vida y han compartido conmigo mis crisis y mis momentos de felicidad, a: Dr. Rafael Montiel (CINVESTAV-Irapuato), Dr. Jaime Ortega López (CINVESTAV-IPN) por haberme recibido gentilmente durante la estancia investigación, por sus consejos, apoyo, paciencia y ánimo. Así como a Mtra. Ivonne Flores Pucheta por compartir sus conocimientos y por brindar su valioso tiempo y amistad. A Vicky Velázquez (CINVESTAV-IPN) por todo el tiempo y apoyo recibido. A Dra. Rosa Hayde Alfaro, Dra. Heidi, Dr. Apolonio Vargas, Dr. Víctor Martínez Juárez, al Dr. Miguel Ángel Míguez, Dra. Martha Gayosso Canales, Dr. Juan Pablo Hernández Uribe, Mtro. Espino, Dr. Edgar García Hernández (ITZ), Dr. René Salgado Delgado (ITZ) por el apoyo y facilidades para la realización de esta tesis.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE CUADROS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
NOMENCLATURA Y SIMBOLOGÍA GRIEGA.....	VII
RESUMEN.....	VIII
<b>CAPÍTULO 1</b>	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
<b>CAPÍTULO 2</b>	
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1. Fermentación.....	3
2.1.1. Importancia de las fermentaciones.....	4
2.1.2. El pozol.....	4
2.1.2.1. Microbiota del pozol.....	5
2.2. Bacterias ácido lácticas.....	6
2.2.1. Clasificación y géneros representativos de las BAL.....	8
2.3. Bacteriocinas.....	
2.3.1. Definición.....	10
2.3.2. Biosíntesis.....	11
2.3.3. Clasificación de las bacteriocinas y modo de acción.....	12
2.3.4. Características de las bacteriocinas.....	20
2.3.5. Estabilidad.....	20
2.3.6. Identificación de bacteriocinas de BAL.....	20
2.3.7. Purificación de bacteriocinas.....	22
2.3.8. Ventajas y limitaciones del uso de bacteriocinas.....	23
2.3.9. Producción de bacteriocinas.....	24
2.4. Procesos de fermentación en la producción de bacteriocinas ...	25
2.5. Estudios relevantes de bioactividad antagonista de sustancias antimicrobianas producidas por diversos géneros de BAL.....	26
2.6. Métodos para determinar la actividad antimicrobiana.....	31
2.7. Bioutilización de residuos de la industria alimentaria como medios de producción de BAL y sus bacteriocinas.....	32
2.8. Salud mundial.....	35

2.8.1. Patógenos en alimentos: Contaminación primaria y sus causas .....	36
2.8.2. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	37
2.9. Bacteriocinas como prospecto de bioconservación en alimentos .....	38
<b>CAPÍTULO 3</b>	
3. JUSTIFICACIÓN .....	40
<b>CAPÍTULO 4</b>	
4. OBJETIVOS .....	42
4.1. Objetivo General.....	42
4.2. Objetivos Específicos.....	42
<b>CAPÍTULO 5</b>	
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	43
<b>CAPÍTULO 6</b>	
6. HIPÓTESIS .....	45
<b>CAPÍTULO 7</b>	
7. MATERIALES Y MÉTODOS .....	46
7.1. Microorganismos.....	46
7.1.1. Microorganismo productos de actividad antimicrobiana: BAL1.....	46
7.1.2. Microorganismo indicador: <i>Listeria monocytogenes</i> .....	46
7.2. Medios de cultivo .....	46
7.3. Fermentación por lote a nivel matraz	
7.3.1. Producción de sustancia antimicrobiana .....	47
7.4. Fermentación por lote a nivel biorreactor.....	48
7.5. Determinación de la concentración de biomasa (X) .....	49
7.6. Evaluación de actividad antimicrobiana .....	50
7.6.1. Prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica).....	50
7.7. Determinación de azúcares reductores totales por el método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS).....	52
7.8. Determinación de ácido láctico .....	53
7.9. Análisis estadístico .....	54

## **CAPÍTULO 8**

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES .....	55
8.1. Fermentación a nivel matraz.....	55
8.1.1. Crecimiento de la BAL1 .....	55
8.1.2. Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante producido por la BAL1 .....	57
8.2. Fermentaciones de la BAL1 a nivel biorreactor	
8.2.1. Crecimiento celular.....	59
8.2.2. Comportamiento del pH.....	62
8.2.3. Producción de ácido láctico.....	63
8.2.4. Evolución de la concentración de fuente de carbono en fermentaciones de la BAL1 .....	66
8.2.5. Actividad antimicrobiana.....	68

## **CAPÍTULO 9**

9. CONCLUSIONES.....	73
----------------------	----

RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES.....	74
---	----

## **CAPÍTULO 10**

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	75
--------------------------------------	----

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1</b>	Clasificación de las bacteriocinas.....	12
<b>Cuadro 2</b>	Modo de acción de bacteriocinas de Clase II .....	17
<b>Cuadro 3</b>	Resumen de estudios relevantes de bioactividad antagonista de sustancias antimicrobianas producidas por diversos géneros de BAL, a través de distintas estrategias de fermentación (matraz o biorreactor), en la última década .....	29
<b>Cuadro 4</b>	Máxima velocidad específica de crecimiento de la BAL1 en matraz agitado orbitalmente (150 rpm, 30°C). Uso de distintos medio complejos .....	56
<b>Cuadro 5</b>	Actividad antimicrobiana (AaM) específica (UA/mg <sub>biomasa</sub> ) producida por la BAL1 crecida en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. Se usó <i>Listeria monocytogenes</i> como indicador .....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), utilizada por las bacterias ácido lácticas homofermentativas (Modificado de Ray, 2007) .....	7
<b>Figura 2</b>	Modo de acción de bacteriocinas (Modificado de Cotter et al., 2013) .....	15
<b>Figura 3</b>	a) Fotografía de biorreactor MTB autoclavable de 3L (Applikon Biotechnology) y b) Esquema del biorreactor exhibiendo algunos elementos importantes como septo de inoculación, toma de muestra, electrodos de pH y dO <sub>2</sub> , suministro de aire y sistema de agitación .....	49
<b>Figura 4</b>	Procedimiento para la realización de la prueba de gota (método de la dilución crítica) .....	51
<b>Figura 5</b>	Curva de calibración método DNS a base de dextrosa .....	53
<b>Figura 6</b>	Aspecto de cultivo sólido de <i>L. monocytogenes</i> durante evaluación de actividad antimicrobiana producida por la BAL1 a nivel de matraz con agitación orbital de 150 rpm y 30°C, a las 12 h de fermentación, mediante prueba de pozos .....	58
<b>Figura 7</b>	Cinética de crecimiento de la BAL1 en medio de cultivo MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. 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 <sup>-1</sup> ) .....	60
<b>Figura 8</b>	Aspecto cualitativo del crecimiento de BAL1 en medio MCA-II en biorreactor, t=12 h (microscopio óptico, 400X) .....	61
<b>Figura 9</b>	Evolución de pH durante fermentación de BAL1 en medio MCA-II. Clave: (-Δ-) 0 vvm; (-○-) 0.5 vvm .....	62
<b>Figura 10</b>	Cinética de producción de ácido láctico durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo MCA-II, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación. a) Evolución de la concentración de ácido láctico mostrando el mejor ajuste de los datos de cada condición de fermentación/aireación al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, Ecuaciones 4 y 5, correspondientes a 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente. Velocidades específicas de producción de	

	ácido láctico ( $\text{g}_{\text{ácido láctico}}/\text{g}_{\text{biomasa h}}$ ) asociadas con las condiciones b) 0 vvm y c) 0.5 vvm .....	63
<b>Figura 11</b>	Cinética de consumo de azúcares por parte de BAL1 creciendo en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. a) Evolución de la concentración de azúcares reductores mostrando el mejor ajuste de todos los datos al modelo Sigmoidal de 4 parámetros (Ec. 6). Con base en la Ecuación 6, predicciones de: b) velocidad de consumo de azúcares ( $\text{g}_{\text{azúcares}}/(\text{L h})$ ), y c) velocidad específica de consumo de azúcares ( $\text{g}_{\text{azúcares}}/(\text{g}_{\text{biomasa h}}$ ) .....	67
<b>Figura 12</b>	Actividad antimicrobiana producida por BAL1 crecida en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. a) Evolución de la actividad antimicrobiana expresada en unidades de actividad por volumen (UA/mL). b) Aspecto de los halos inhibitorios del crecimiento de <i>Listeria monocytogenes</i> durante los experimentos para determinar actividad antimicrobiana producida por la BAL1 .....	69
<b>Figura 13</b>	Rendimientos asociados con el cultivo de BAL1 en medio MCA-II, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación: a) Rendimiento de azúcares a biomasa tanto (el mismo tanto a 0 vvm como 0.5 vvm); b) Rendimiento de azúcares a ácido láctico, caso 0 vvm; y c) Rendimiento de azúcares a ácido láctico, caso 0.5 vvm .....	71



## NOMENCLATURA

AaM	Actividad antimicrobiana	(UA/mL)
AaM específica	Actividad antimicrobiana específica	(UA/mg <sub>biomasa</sub> )
BAL	Bacterias ácido lácticas	
BAL1	Bacteria ácido láctica aislada de pozol	
D	Factor de dilución	
DE	Desviación estándar	
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato ferroso	
Lm	<i>Listeria monocytogenes</i>	
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de Magnesio	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	Cloruro de Manganeso tetra hidratado	
N	Agitación	(rpm)
NaCl	Cloruro de sodio	
PM	Peso molecular	
PS	Peptona de soya	
p/v	Relación peso/volumen	(%)
SD	Suero dulce	
UA	Unidades de actividad	
UI	Unidades internacionales	
V <sub>NaOH</sub>	Gasto del agente titulante	(mL)
V <sub>muestra</sub>	Alícuota de muestra titulada	(mL)
v/v	Relación volumen/volumen	(%)
vvm	Volumen de aire por volumen de medio de cultivo por minuto	
X	Concentración de biomasa	(g/L)
Y <sub>AL/CH</sub>	Rendimiento máximo de azúcares a ácido láctico	(gÁcido Láctico/gAzúcares)
Y <sub>X/CH</sub>	Rendimiento máximo de azúcares reductores a biomasa	(gBiomasa/gAzúcares)

## SIMBOLOGÍA GRIEGA

ΔR	Incremento de radio de inhibición	(mm)
μ <sub>máx</sub>	Máxima velocidad específica de crecimiento	(h <sup>-1</sup> )

## RESUMEN

En la industria alimentaria es de interés la búsqueda de bacteriocinas con potencial de aplicación como aditivos alimentarios, especialmente aquellas producidas por bacterias ácido lácticas nativas (BAL). El objetivo principal de este trabajo fue determinar condiciones adecuadas para producir actividad antimicrobiana (AaM) a partir de una BAL aislada de pozol –denominada BAL1- en cultivos en biorreactor, usando medios complejos. Como primera etapa de esta investigación, se evaluaron diferentes medios de cultivo para la producción de BAL1 a nivel matraz, formulando los medios de acuerdo con balances de nitrógeno y carbohidratos, en base al medio MRS. En la segunda etapa del trabajo, el proceso de fermentación de BAL1 se realizó en tanque agitado mecánicamente a 200 rpm (2 turbinas Rushton de 45 mm de diámetro) y 30°C, evaluando dos condiciones de aireación, 0 L/min y 1 L/min, usando 2.4 L de medio MCA-II (Medio APT (Evans y Niven, 1951) (Peptona de caseína (1% p/v), Extracto de levadura (0.5% p/v),  $K_2HPO_4$  (0.5% p/v), Citrato de sodio (1.2% p/v), NaCl (1.2% p/v), Dextrosa Anhidra (1% p/v),  $MgSO_4$  (0.08% p/v),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.1% p/v),  $FeSO_4$  (0.004% p/v)), Tween 80 (0.3% p/v) y Lactosuero en polvo (1% p/v). Se determinó la máxima concentración de biomasa a las 9 h de proceso, en ambas condiciones de aireación ( $X_{promedio}=1.65$  g/L; Desviación estándar,  $DE=0.19$ ), mostrando una  $\mu_{m\acute{a}x}$  de  $0.56$  h<sup>-1</sup>. Los rendimientos máximos de azúcares a biomasa ( $Y_{X/CH}$ ) y a ácido láctico ( $Y_{AL/CH}$ ) ocurrieron dentro de la fase de crecimiento exponencial, siendo  $Y_{X/CH}=0.135$  gBiomasa/gAzúcares, tanto para 0 vvm como 0.5 vvm; mientras que  $Y_{AL/CH}$  fue mayor ( $0.497$  gÁcido Láctico/gAzúcares) para 0 vvm, que el correspondiente rendimiento para 0.5 vvm ( $0.44$  gÁcido Láctico/gAzúcares). Para evaluar la AaM se usó a *Listeria monocytogenes* como microorganismo indicador, mediante la técnica de difusión en agar, expresando la AaM como Unidades de Actividad por mL de caldo de fermentación (UA/mLcaldo de fermentación). El máximo valor AaM fue 2380 (UA/mL) ( $DE=923$ ) a las 9 h del proceso a 0 vvm, mientras que para la condición 0.5 vvm, éste fue 3498 (UA/mL) ( $DE=1262$ ) y se presentó a las 6 h. El máximo valor de AaM específica fue 2884 UA/mgbiomasa, presentándose a las 3 h en las fermentaciones aireadas a 0.5 vvm.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los consumidores demandan alimentos libres de patógenos, con procesamiento mínimo y el uso de pocos conservadores y aditivos pero sin que éstos pierdan la calidad sensorial. Como respuesta a estas demandas crecientes, una de las tendencias de la industria de los alimentos es recurrir al uso de inhibidores microbianos alternativos que permitan la seguridad alimentaria. La preservación de alimentos implica reducir o eliminar esporas y microorganismos patógenos presentes en los mismos. La aplicación de cultivos bioprotectores que aseguran la calidad higiénica debe considerarse sólo como medida adicional a las buenas prácticas de manufactura, procesamiento, almacenamiento y distribución (Castellano et al., 2008).

En los alimentos fermentados, las bacterias ácido lácticas (BAL) generan diversas actividades antimicrobianas como resultado de la producción de ácidos orgánicos y otros compuestos, tales como las bacteriocinas y péptidos antifúngicos. Las bacteriocinas se clasifican en tres grupos de acuerdo a sus propiedades, estructura, peso molecular (PM) y espectro antimicrobiano: los lantibióticos y no lantibióticos de bajo peso molecular, y los de alto peso molecular. Se han empleado varias estrategias para la purificación de bacteriocinas de caldos de fermentación con medios de cultivo complejos, probándose entre otros procedimientos biotecnológicos: la extracción con disolventes, ultrafiltración, adsorción-desorción, intercambio iónico, y cromatografía de exclusión de tamaño, por mencionar algunos. La estructura y funcionalidad de las bacteriocinas ayudará a entender las bases moleculares de su especificidad y mecanismos de acción. La nisina es un buen ejemplo de bacteriocina con éxito comercial pero se requiere continuar el estudio y desarrollo de nuevas bacteriocinas y sus aplicaciones biotecnológicas. Estas sustancias en concentraciones apropiadas pueden ser utilizadas como un factor de barrera adicional para el aumento de la vida útil de los alimentos mínimamente procesados (Balciunas et al., 2013; Vandenberg, 1993).

En los últimos años diversas bacteriocinas producidas por BALs aisladas de alimentos y bebidas tradicionales, han sido producidas, purificadas y caracterizadas, exhibiendo gran potencial industrial, particularmente en aplicaciones alimentarias (Díaz-Ruiz et al., 2003; Díaz-Ruiz et al., 2012; Escalante, 2004). Por otro lado, el uso de lactosuero como ingrediente importante de medios de cultivo alternativos para la producción de bacteriocinas por BAL, puede contribuir significativamente a la generación de valor agregado mediante procesos rentables (González-Toledo et al., 2010).

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1. Fermentación**

La fermentación de alimentos es una “biotecnología” muy vieja, es la responsable de diferentes atributos en los alimentos fermentados, tales como sabor, vida media, textura y beneficios en la salud. Este proceso involucra una amplia gama de microbios y procesos enzimáticos para alcanzar las características deseadas, así como prolongar la vida media, enriquecimiento nutricional, etc.

De acuerdo con algunos autores la fermentación es “el proceso en el cual cambios químicos son provocados por sustratos orgánicos a través de la acción de enzimas elaboradas por microorganismos”. Desde el punto de vista bioquímico, la fermentación es el proceso metabólico en el cual los carbohidratos y compuestos relacionados son parcialmente oxidados con la liberación de energía en ausencia de aceptores de electrones externos. Los aceptores de electrones finales son compuestos orgánicos producidos directamente de la degradación de los carbohidratos. En consecuencia, ocurre una oxidación incompleta del compuesto iniciador y son liberadas pequeñas cantidades de energía durante este proceso. Los productos de la fermentación consisten en algunos compuestos más reducidos que otros (Jay, 2000). En diversas fermentaciones participan una mezcla de poblaciones de bacterias de distintas especies, o de bacterias con levaduras y hongos. El máximo crecimiento de microorganismos deseables y su velocidad óptima de fermentación son dependientes de parámetros ambientales tales como, “calidad” de nutrientes y su concentración, temperatura, potencial óxido-reducción y pH, entre otros. Si hay diferentes especies microbianas participantes se necesitan distintas condiciones ambientales para facilitar el crecimiento de todas las especies (Ray, 2007). Los procesos fermentativos también pueden contribuir a la seguridad alimentaria por reducción de compuestos tóxicos tales como aflatoxinas y compuestos cianogénicos, así como por la producción de factores antimicrobianos tales como bacteriocinas, dióxido de

carbón, peróxido de hidrógeno y etanol que facilitan la inhibición o eliminación de patógenos presentes en alimentos (Giraffa, 2004).

### **2.1.1. Importancia económica de las fermentaciones**

El consumo de productos fermentados se ha incrementado a partir del año 1970. Esto incluye alimentos de consumo diario como el yogur, queso, bebidas alcohólicas, embutidos, etc. Una de las razones del incremento en el consumo de estos productos es porque el consumidor considera que estos alimentos son altamente sanos y naturales. El consumir microorganismos deseables y sus productos metabólicos en los alimentos fermentados es totalmente confiable para los consumidores. El siguiente paso sería incorporar los mismos compuestos antimicrobianos que se encuentran naturalmente en alimentos fermentados, en otros alimentos en lugar de usar “conservadores químicos” (Giraffa, 2004).

El análisis de la diversidad bacteriana en alimentos fermentados es el primer paso en el estudio de su microbiología. Los alimentos fermentados tradicionales son ambientes ricos en diversidad de microorganismos en sustratos específicos (Marsh et al., 2014). La producción de estos microorganismos puede ser optimizada y ser fuentes para explorar y desarrollar cultivos iniciadores (Escalante et al., 2001). En México, productos fermentados indígenas como el pulque y el pozol se han estudiado para caracterizar su diversidad bacteriana, encontrándose que algunos de sus miembros podrían ser usados como productores de bacteriocinas o sustancias con actividad antimicrobiana (Díaz-Ruiz et al., 2003; Escalante, 2004; Escalante et al., 2001).

### **2.1.2. El pozol**

El término pozol viene del náhuatl *pozolli*, que significa espumoso, siendo una bebida ácida y refrescante hecha a base de masa fermentada de maíz, que se consume desde la época prehispánica en el sureste de México (Tavera-Montes, 2010). El procesamiento de maíz para la producción de pozol implica un primer

paso que se conoce como nixtamalización, que corresponde al sometimiento de los granos de maíz a tratamiento térmico por inmersión en solución de cal, en ebullición, aproximadamente 1.5 h. Los granos son entonces descascarados y lavados. El agua de lavado (llamada *nejayote*) se desecha y los granos de maíz (nixtamal) son molidos y se forman bolas de masa, que se envuelven en hojas de plátano y se dejan fermentar por varios días. El principal azúcar soluble del maíz es la sacarosa y constituye el 2%, base seca. El pozol que es preparado el mismo día no es muy ácido, sin embargo presenta cierto grado de fermentación. El tiempo que transcurre desde su preparación hasta su consumo es aproximadamente de 8 h, lo cual es suficiente para que se desarrollen las bacterias lácticas, responsables de la acidificación (Díaz-Ruiz et al., 2003).

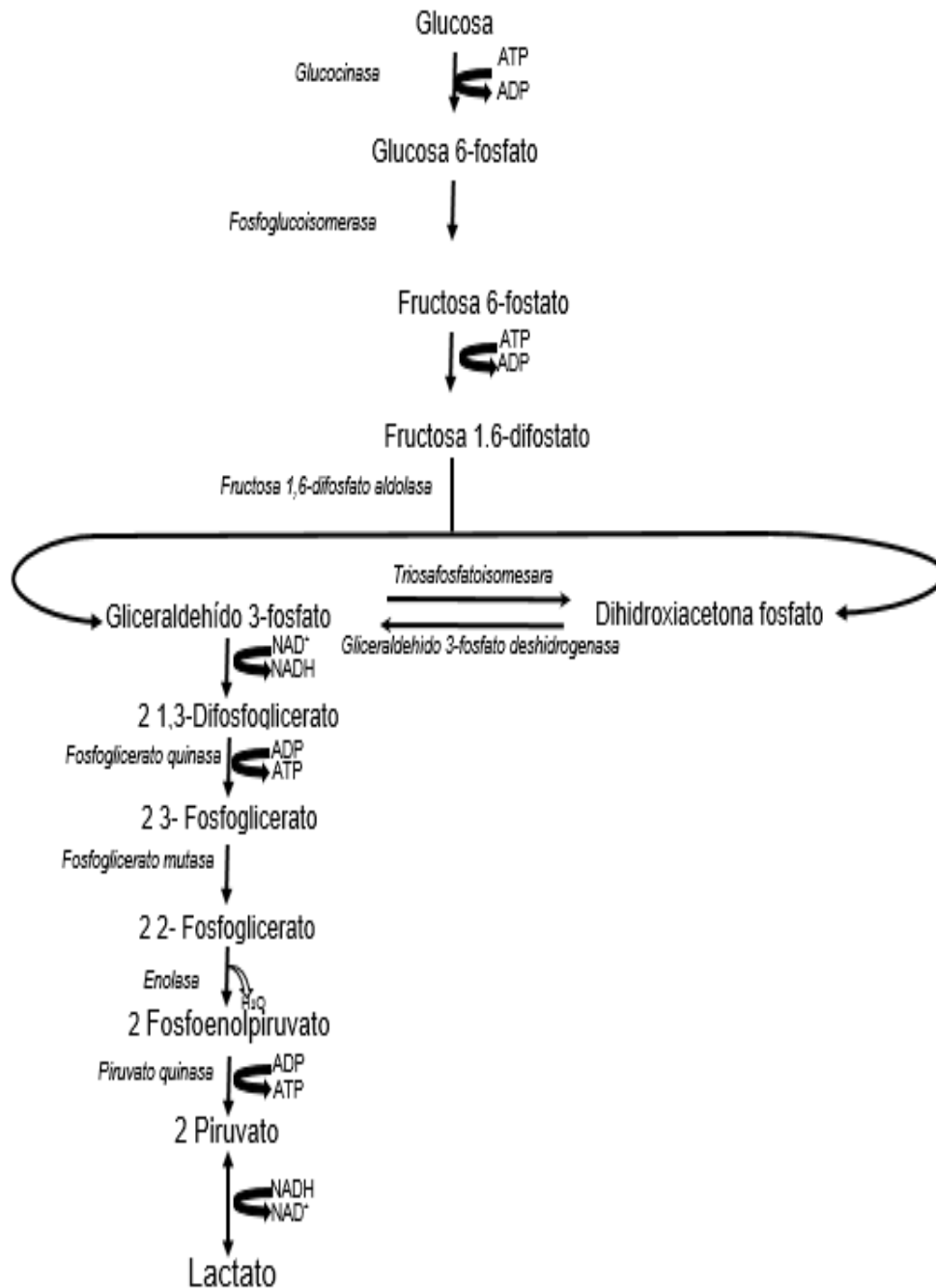
#### **2.1.2.1. Microbiota del pozol**

La fermentación del pozol es llevada a cabo por un consorcio microbiano natural, constituido por bacterias, levaduras y hongos (Escalante et al., 2001). Diferentes estudios han demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) representan un porcentaje importante del total de la microbiota de la masa del pozol (89% – 94% de la microbiota activa), están presentes en todas las etapas de la fermentación y son las responsables de la acidificación del pozol. Escalante y colaboradores (Escalante et al., 2001) han identificado la presencia de las siguientes BAL: *Lactococcus lactis*, *Streptococcus suis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus casei*, *Lactococcus alimentarium*, *Lactococcus delbrueki* y *Clostridium* sp. Por su parte, Díaz-Ruiz y colaboradores (Díaz-Ruiz et al., 2003) identificaron la presencia de cuatro microorganismos en pozol: *Streptococcus bovis* (predominante), *Streptococcus macedonicus*, *Lactococcus lactis* y *Enterococcus sulfureus*.

## 2.2. Bacterias ácido lácticas

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo heterogéneo de bacterias Gram-positivas, anaeróbicas pero aerotolerantes, capaces de fermentar carbohidratos para producción de energía y ácido láctico (Parada et al., 2007). Éstas se dividen en dos grupos basado en sus productos finales del metabolismo de la glucosa. A las BAL que producen ácido láctico en mayor cantidad, o solo éste como producto de la fermentación de glucosa, son denominadas homofermentativas (homolácticas). Las BAL homofermentativas usan la glucólisis vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), observándose este patrón cuando la glucosa es metabolizada pero no necesariamente son metabolizadas las pentosas (algunas homolácticas producen ácido acético y ácido láctico cuando utilizan pentosas). El carácter homofermentativo de las homolácticas puede ser cambiado por alteración de las condiciones de crecimiento tales como la concentración de glucosa, pH y limitación de nutrientes (Figura 1). A las BAL que producen igual cantidad molar de lactato, dióxido de carbono y etanol a partir de hexosas se les designa como heterofermentativas (Jay, 2000; Parada et al., 2007). Además, puede presentarse la producción de ácido acético, etanol, compuestos aromáticos, bacteriocinas, exopolisacáridos y enzimas de importancia, entre otros (Leroy y De Vuyst, 2004). Los miembros de los géneros *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* y *Vagococcus* son homofermentativas. Entre las heterofermentativas se encuentran *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Lactosphaera* y algunos lactobacilos. Las heterolácticas son responsables de la producción de componentes aromáticos tales como acetaldehído y diacetilo (Jay, 2000; Lagaron, 2012) y dan atributos específicos organolépticos a los productos (Parada et al., 2007).





**Figura 1.** Vía Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), utilizada por las bacterias ácido lácticas homofermentativas (Modificado de Ray, 2007).

Estos microorganismos se pueden encontrar en leche, carne y productos fermentados, inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos o

microorganismos de la descomposición, contribuyendo al mantenimiento del valor nutritivo e incrementando la vida de anaquel de los alimentos (Lagaron, 2012). Las BAL también son usadas como productoras de sabor y desarrolladoras de texturas (Parada et al., 2007). El descenso del pH durante la fermentación como resultado de la producción de ácido láctico y otros ácidos orgánicos, es un factor importante para la inhibición del crecimiento de microorganismos indeseables. La competencia por nutrientes esenciales, la acumulación de D-aminoácidos y la disminución del potencial de óxido-reducción también contribuyen a su efecto inhibitorio. Una amplia variedad de especies y cepas de BAL son empleadas como cultivos iniciadores en el procesamiento de alimentos a base de carnes, vegetales y productos de panificación; además también son parte de la microbiota intestinal con efectos beneficiosos en la salud humana. Las BAL son reconocidas generalmente como organismos seguros (GRAS por sus siglas en inglés) y consideradas como organismos de “grado-alimentario” (Balciunas et al., 2013; Lagaron, 2012).

### **10.1.1. Clasificación y géneros representativos de las BAL**

El grupo de las BAL está comprendido por aproximadamente 20 géneros, siendo los siguientes los más representativos:

<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactophaera</i>	<i>Streptococcus</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Tetragenococcus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Vagococcus</i>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Weissella</i>

Todos los representantes comparten la propiedad de producir ácido láctico a partir de las hexosas (Jay, 2000). Los géneros que se describen a continuación son los más relevantes en alimentos:

## ***Lactobacillus***

Tienen forma bacilar, variando desde bacilos largos y delgados a cortos y curvos, no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos (pH entre 1.0 y 5.0), de requerimientos nutricionales complejos, temperatura de desarrollo de 2°C a 35°C, teniendo como óptimo un rango de 30 a 40°C (Jay, 2000). Es común que produzcan bacteriocinas (Jay, 2000; Ray, 2007).

## ***Streptococcus***

Son células esféricas u ovoides de 0.7 a 0.9  $\mu\text{m}$  de diámetro, se encuentran en pares o formando cadenas largas. Estas bacterias crecen en rangos de temperatura de 37 a 40°C, también se ha visto su crecimiento a 52°C. Son anaerobios facultativos y en caldos de glucosa pueden reducir el pH a 4.0 produciendo ácido láctico. Son capaces de fermentar fructosa, lactosa, manosa, pero generalmente no fermentan galactosa ni sacarosa.

## ***Leuconostoc***

Bacterias Gram-positivas de forma esférica o lenticular, en pares o cadenas, no móviles, no esporuladas, catalasas negativas y anaerobias facultativas. Crecen en rangos de temperatura de 20 a 37°C. Fermentan la glucosa a ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol o ácido acético, reduciendo el pH a 4.5-5.0. *Leuconostoc* es un grupo heterogéneo y contiene una amplia diversidad genética; se han creado dos nuevos géneros de este grupo: *Weissella* y *Oenococcus*.

## ***Pediococcus***

Tienen forma esférica y forman tétradas, pero también pueden presentarse en pares. Su crecimiento puede presentarse entre 25 a 40°C; algunas especies crecen a 50°C. Fermentan glucosa a L(+)-ácido láctico y DL ácido láctico. Algunas especies reducen el pH hasta 3.6. Dependiendo de la especie pueden fermentar

sacarosa, arabinosa, ribosa y xilosa. Generalmente no fermentan la lactosa, sin embargo algunas cepas si tiene esta capacidad.

## 2.3. Bacteriocinas

### 2.3.1. Definición

El término bacteriocina fue usado inicialmente en 1953 para designar a las proteínas con actividad antibacteriana; sin embargo, este término se redefinió posteriormente como “proteínas bactericidas caracterizadas por su actividad letal en un intervalo muy limitado y adsorción específica sobre células sensibles”. Por su parte, Parada y colaboradores (Parada et al., 2007) definen a las bacteriocinas como proteínas o complejos de proteínas, biológicamente activos con actividad antimicrobiana, siendo rápidamente digeridas por las proteasas que se encuentran en el tracto digestivo. Las bacteriocinas producidas por BAL pueden tener actividad mayormente contra bacterias Gram-positivas; no obstante, también se han observado efectos contra bacterias Gram-negativas sensibles (Cleveland et al., 2001; Castellano et al., 2011; Lagaron, 2012).

Esta definición ha sido modificada, refiriéndose como bacteriocinas a los compuestos proteicos antimicrobianos producidos por bacterias que tienen actividad contra otras bacterias (Lagaron, 2012). El nombre asignado a cada bacteriocina deriva del género o especie de la bacteria productora, agregando el “cina”. Por ejemplo, pediocina es una bacteriocina producida por *Pediococcus acidilacti* (Alquicira-Paez, 2006). Es común que al contar con aislados bacterianos productores de posibles bacteriocinas, éstas sean purificadas y estudiadas en sus determinantes genéticos (Balciunas et al., 2013).

### **2.3.2. Biosíntesis**

Las bacteriocinas son usualmente sintetizadas como pre-péptidos que tienen una secuencia N-terminal. Estos precursores son transportados a la superficie de la célula durante la fase de crecimiento exponencial y son convertidos enzimáticamente a sus formas activas. Para la clase II, accesoriamente las proteínas son usadas para facilitar la translocación de la membrana y/o la escisión del péptido. El sistema de regulación para producción de bacteriocinas está compuesto de tres componentes: un péptido de inducción (o factor feromona-activación), la quinasa histidina transmembrana (feromona receptora) y un regulador de respuesta. El péptido inductor es sintetizado en el ribosoma a bajos niveles como un pre-péptido, el cual es secretado al medio externo por un sistema de transporte. Cuando este compuesto alcanza una concentración límite, la histidina quinasa transmembranal es activada, lo cual permite la autofosforilación del residuo de histidina, por lo tanto la transferencia de fosfato a una proteína reguladora de respuesta. El regulador fosforilado activa la transcripción de la bacteriocina, además de los elementos que componen el sistema de regulación, iniciando una retroalimentación positiva. La regulación de la producción de antibióticos, tales como la nisina y subtilina, se realiza por la propia bacteriocina que actúa como una feromona de la inducción de su producción en altos niveles.

El mecanismo de la inmunidad de las bacterias productoras de bacteriocina hace distinción entre bacteriocina producida por ellas mismas y por otros microorganismos. La protección puede ser promovida por una proteína específica y/o un sistema transportador. El mecanismo por el que trabajan es similar, por el “secuestro” de la proteína estructural o por competencia antagonista para el receptor de la bacteriocina (Balciunas et al., 2013).

### 2.3.3. Clasificación de las bacteriocinas y modo de acción

Las bacteriocinas se clasifican comúnmente en cuatro grupos de acuerdo a su estructura primaria, características bioquímicas y génicas (Cuadro 1) (Hécharad y Sahl, 2002; Lagaron, 2012; Balciunas et al., 2013).

La clase I está compuesta por péptidos modificados llamados lantibióticos, la clase II reúne a los péptidos no modificados, la clase III y IV están compuestas por bacteriocinas grandes cuya forma de acción es aun pobremente estudiada (Hécharad y Sahl, 2002).

**Cuadro 1.** Clasificación de las bacteriocinas (Hécharad y Sahl, 2002; Lagaron, 2012; Balciunas et al., 2013)

Clase	Características	Subdivisión	Descripción	Ejemplo de bacteriocina
<b>Clase I (lantibióticos)</b>	Péptidos pequeños (<5kDa) sintetizados ribosómicamente caracterizados por la presencia de aminoácidos tioéter, los cuales son generados a través de modificación postraduccional.	<b>I A</b>	Inhiben a las células sensibles por depolarización de la membrana citoplasmática, son más grandes que los lantibióticos tipo B	Nisina
<b>Clase II (no lantibióticos)</b>	Son pequeños (<10 kDa), termoestables, membrana activa; contienen péptidos no lantibióticos	<b>II A</b>	Es el grupo más grande y se caracteriza por su actividad antilisteria	Pediocina
		<b>II B</b>	Son formadores de complejos (dos péptidos diferentes), ambos acentúan la actividad	lactocina A lactocina B

antimicrobiana		
	IIC	Presentan enlaces covalentes entre sus extremos C y N, presentan formas cíclicas
		divergicina
Clase III	Grandes (>30 kDa), son bacteriocinas termolábiles activas en pared celular	helveticinas J y V
Clase IV	Incluye un complejo de bacteriocinas que contienen glicoproteínas o lipoproteínas que requieren residuos no proteicos para su actividad	leuconocina S lactocina 27

### Clase I (lantibióticos)

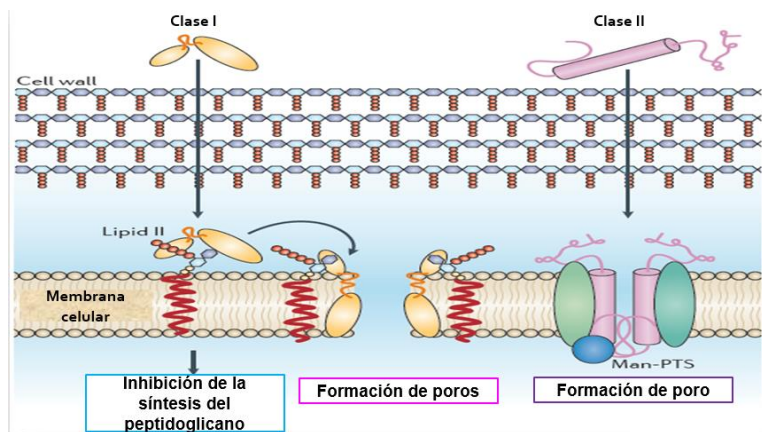
Estos son péptidos pequeños (<5kDa), termoestables, sintetizados ribosómicamente caracterizados por la presencia de aminoácidos tioéter (residuos de lantionina, Lan;  $\beta$ -metil-lantionina, MeLan; dehidrolanina y dehidrobutirina), los cuales son generados a través de modificación postraducciona. Los lantibióticos son subdivididos en tipo A (subtipos lineales) y tipo B (subtipos globulares) basados en la estructura química y su modo de acción antimicrobiana.

Una proporción sustancial de los péptidos de las bacteriocinas de bacterias Gram-positivas sufren modificación postraducciona antes de ser exportadas fuera de la célula. Las modificaciones más prominentes incluyen la deshidratación de los residuos serina y treonina a didehidroalanina (Dha) y didehidrobutirina (Dhb), respectivamente, y la posterior adición de residuos de cisteína convenientemente situadas a través de sus grupos SH al doble enlace C=C de Dha o Dhb. Los aminoácidos resultantes tioéter de esta reacción de adición son, en contraste con los enlaces disulfuro, ácidos estables y pueden ser identificados en péptidos hidrolizados como lantionina y 3-metil lantionina. Fue por la presencia de lantionina que se propuso la designación de “lantibióticos” a los péptidos

antibióticos que contienen lantionina. Parece que solo la presencia de enzimas específicas para la deshidratación de aminoácidos y la formación de tioéter puede distinguir un grupo de genes de biosíntesis de lantibióticos de las bacteriocinas de la clase II. La nisina y la epidermina, que son lantibióticos ya estudiados, usan primariamente el lípido II como molécula de acoplamiento para la formación de poros en la célula diana. Simultáneamente, la biosíntesis de la pared celular es inhibida a través de la detección del precursor en la membrana. Entonces, se ha demostrado que la actividad antibiótica está basada en una multiplicidad de actividades las cuales podrían ser combinadas de forma distinta para cada bacteria diana individual y explicar así el rango de sensibilidades de varias especies bacterianas (Hécharad y Sahl, 2002)

Los péptidos catiónicos anfífilos están muy difundidos en la naturaleza. Son producidos por microorganismos competidores antagonistas y por plantas, insectos e invertebrados como moléculas para combatir infecciones microbianas. Los efectos destructivos de los compuestos anfífilos en la membrana con carga superficial negativa han sido demostrados a lo largo del tiempo. Estos péptidos matan a las células bacterianas por interferencia con la transferencia de energía que ocurre en la membrana citoplasmática; estos péptidos inhiben inmediatamente los procesos de biosíntesis de macromoléculas tales como DNA, RNA, proteínas y polisacáridos. Entonces las células bacterianas son incapaces de retener aminoácidos y los iones inorgánicos y pequeños metabolitos comienzan a filtrarse hacia el exterior de la célula. Con el fin de evitar una situación desfavorable de los residuos polares de las cadenas de acilo de lípidos, varios monómeros de péptidos se ensamblan formando un haz de hélices. Después de la inserción de los péptidos dentro de la membrana, los sitios no polares de los péptidos interactúan con el centro lipídico hidrofóbico de la membrana y las cadenas laterales hidrofílicas apuntan hacia adentro, lo cual tiene como resultado la formación de un poro lleno de agua. Ambos, el tamaño y la estabilidad dependen del número de péptidos involucrados en la formación del poro (Figura 2) (Hécharad y Sahl, 2002).





**Figura 2.** Modo de acción de bacteriocinas (Modificado de (Cotter et al., 2013))

En un esquema general los lantibióticos actúan sobre la membrana citoplasmática de las bacterias. Algunos, por ejemplo, mersacidina, actagardina y el grupo cinamicina, se unen a lípidos específicos e inhiben enzimas de reacciones posteriores. Los lantibióticos catiónicos anfífilos, a concentraciones micromolares, rompen la membrana. Adicionalmente, también se pueden unir por afinidad a dianas específicas usándolas como objetivos para la formación de poros. En el caso de la nisina, la formación de poros se da por la unión de ésta al lípido II. Cuando se forman los poros se bloquea la función natural de la célula, produciendo de este modo actividades antibióticas muy eficaces dadas por el lantibiótico correspondiente. Existen otros efectos antibióticos, tales como la inducción de la autólisis por nisina y Pep5, que complican aún más el modo de acción, explicando porque los lantibióticos son tan potentes por lo que es importante la producción de estas sustancias (Hécharad y Sahl, 2002).

La bacteriocina representativa de este grupo es la nisina, sintetizada por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, es la única bacteriocina purificada aprobada para uso en alimentos en los Estados Unidos de América y en Europa. En 1988 fue aprobada por la FDA como GRAS para su uso como ingrediente directo en los

alimentos para consumo humano (Lagaron, 2012). La nisina ha sido utilizada en la industria alimentaria como agente antibotulínico en quesos, salchichas y productos enlatados. Exhibe un amplio espectro contra *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y otros patógenos, así como algunas especies de BAL. Los cambios en la permeabilidad de la membrana a través de los poros, es la causa responsable de la muerte de la célula. Los productos con nisina como aditivo en alimentos pueden contener hasta 15 mg/kg de nisina pura, ha sido también incluida como ingrediente bioconservador en la lista Europea de aditivos alimentarios, donde se le designó el número E234 (Lagaron, 2012; Balciunas et al., 2013).

**Clase II (no-lantibióticos):** Esta clase está compuesta de pequeños péptidos termoestables (<10kDa), con estructura de hélice anfifílica que permite su inserción en la membrana citoplasmática de la célula, lo que promueve la despolarización de la membrana y la muerte de la célula.

Estas bacteriocinas forman un poro en la membrana citoplasmática, y aunque no hay datos experimentales claros que apoyen esta hipótesis, se han sugerido diferentes modelos de formación de poros por dichas bacteriocinas, teniendo en cuenta que estas bacteriocinas son pequeños péptidos anfifílicos. Varios factores influyen en la actividad de la bacteriocina en la célula bacteriana, entre éstos se incluyen la estructura y la cantidad de bacteriocina, la composición y el potencial de la membrana citoplasmática, la estructura y el nivel de expresión de una proteína con función de inmunidad y la composición química del medio ambiente. Uno de los hallazgos recientes más importantes de las bacteriocinas de la subclase II es que para activarse debe encontrarse en la superficie de la célula diana. En el Cuadro 2 se resume el modo de acción de las bacteriocinas de la Clase II.

**Cuadro 2.** Modo de acción de bacteriocinas de Clase II. (Modificado de Héchard y Sahl, 2002).

<b>Bacteriocina</b>	<b>Modo de Acción</b>	<b>Efectos en la célula diana</b>
Subclase IIa Bavaricina MN Enterocina P Mesentericina Y105 Pediocina PA-1	Formación de poros Poros por K <sup>+</sup> Permeasa PTS forma poros Formación de poros	Flujo de K <sup>+</sup> Flujo de Aminoácidos Flujo de Aminoácidos K <sup>+</sup> Agotamiento de ATP intracelular
Subclase IIb Lactacina F Lactococcina G Plantaricina EF Plantaricina JK	Formación de poros Formación de poros Poros catiónicos Poros aniónicos	Flujo de K <sup>+</sup> y Pi Agotamiento de ATP intracelular Flujo de aminoácidos Agotamiento de ATP intracelular Flujo de cationes Flujo de aniones
Subclase IIc Lactococcina A Plantaricina A	Formación de poros Formación de poros	No presenta flujo de sustancias

**Subclase IIaA:** En esta subclase se incluyen las bacteriocinas que muestran especificidad contra *L. monocytogenes*. Tienen 37 a 48 residuos de aminoácidos con una porción N-terminal en la configuración de hoja plegada y un extremo C-terminal que contiene una o dos  $\alpha$ -hélices. Las bacteriocinas de esta clase actúan en la membrana celular del microorganismo diana por el C-terminal, lo que provoca la formación de poros y la consiguiente disipación de la fuerza motriz de protones; intentando mantener o restablecer la fuerza motriz de protones, no hay aceleración en el consumo de ATP y en consecuencia la muerte celular. Las bacteriocinas subclase IIA muestran un espectro estrecho y actividad específica contra una cepa. Las pequeñas diferencias en la composición de fosfolípidos entre cepas de la misma especie o entre cepas relacionadas difícilmente podrían explicar tal espectro tan específico. Se ha propuesto la participación de una proteína superficial como una molécula diana, por ejemplo, una permeasa de manosa ( $EII_t^{Man}$ ) se ha propuesto como molécula diana para mesentericina Y105 y leucocina. Se ha propuesto la proteína  $EII_t^{Man}$  como molécula diana para todas las bacteriocinas de la Subclase IIA. Por otro lado, varias subclases de bacteriocinas IIA son capaces de permeabilizar los liposomas formados por los lípidos de las células diana, lo que apoya la idea de que no es necesario un objetivo proteínico para la actividad. Primero la bacteriocina interactúa con una molécula diana, posiblemente la permeasa manosa  $EII_t^{Man}$ . Esta interacción es absolutamente requerida para la actividad *in vivo* contra otras células bacterianas, probablemente favoreciendo las interacciones futuras con la membrana citoplasmática. En este caso, la estructura y el nivel de expresión de la molécula diana puede influir en la actividad de la bacteriocina. La posible interacción de la bacteriocina con la  $EII_t^{Man}$  puede permitir el cambio de esta permeasa a un estado abierto y de este modo poder participar en la permeabilización de la célula diana. En segundo lugar, la bacteriocina puede interactuar con la membrana citoplasmática permitiendo tanto la formación de poros como la disrupción de la membrana. Este segundo paso podría no requerir de una molécula diana y puede ser mayormente dependiente de las interacciones electrostáticas y/o hidrofóbicas con la membrana, lo que explica

porque estas bacteriocinas podrían tener actividad contra los liposomas o las vesículas fosfolipídicas (Hécharad y Sahl, 2002; Cotter et al., 2013)

La pediocina es la única bacteriocina que pertenece a la subclase IIA que se sintetiza no sólo por diferentes especies, sino también por diferentes géneros de BAL. Ésta fue detectada inicialmente en *Pediococcus acidilacti*. Sin embargo, se ha encontrado que otras cepas y especies de *Pediococci* como productoras de pediocina. Usualmente éstas son termoestables (121°C por 15 min) y resistentes a liofilización y almacenamiento hasta -20°C por periodos prolongados. Algunos autores han reportado estos compuestos con actividad antimicrobiana selectiva especialmente contra especies del género *Listeria* (Ennahar et al., 1999; Hécharad y Sahl, 2002).

**Subclase IIB:** Este conjunto incluye bacteriocinas heterodiméricas, i.e. bacteriocinas que para su actividad requieren de la combinación de dos péptidos. Su mecanismo de acción también involucra la disipación del potencial de membrana y un decremento en la concentración intracelular de ATP. Estos péptidos, cuando son empleados individualmente, tienen muy poca o nula actividad (Parada et al., 2007; Balciunas et al., 2013).

Todas las bacteriocinas de la subclase IIB forman poros dentro de la membrana de la célula diana permitiendo su permeabilización, dichas bacteriocinas exhiben diferentes mecanismos de acción, de acuerdo con diferencias encontradas en su estructura primaria (Hécharad y Sahl, 2002).

**Subclase IIC:** Estas bacteriocinas presentan la peculiaridad de formar enlace covalente entre C y N terminales, lo que resulta en una estructura cíclica. Son péptidos sin estructura similar, están involucradas en varias funciones tales como la permeabilización de la membrana, actividad de feromona y formación del poro de inhibición.

**Clase III:** Son bacteriocinas grandes (>30 kDa) termolábiles. Su mecanismo de acción es diferente a otras bacteriocinas, promoviendo la lisis celular en la pared

de la célula. Su porción N-terminal es homóloga a una endopeptidasa implicada en la síntesis de la pared celular, mientras que la porción C-terminal es responsable del reconocimiento de la célula diana (Balciunas et al., 2013; Lagaron, 2012).

**Clase IV:** incluye un complejo de bacteriocinas que contienen glicoproteínas o lipoproteínas que requieren residuos no proteicos para su actividad (Balciunas et al., 2013).

#### **2.3.4. Características de las bacteriocinas**

El uso de las bacteriocinas producidas por BAL en la industria de los alimentos está justificado porque: (1) no son tóxicas para los humanos, (2) no alteran las propiedades nutricionales y organolépticas de los alimentos, (3) son efectivas a concentraciones bajas, (4) son suficientemente estables durante el almacenamiento, y (5) son reconocidas por las autoridades reguladoras (Cotter et al., 2013; Lagaron, 2012).

#### **2.3.5. Estabilidad**

Algunos estudios de caracterización de bacteriocinas han mostrado que estas moléculas pueden ser activas bajo ciertos rangos de temperatura y pH. Se ha evidenciado su sensibilidad a enzimas proteolíticas; su característica termo-resistente podría estar relacionada con su estructura molecular, usualmente compuesta de pequeños péptidos sin presentar estructura terciaria (Parada et al., 2007). Dicha estabilidad puede ser atribuida a la formación de estructuras globulares pequeñas y a la presencia de regiones fuertemente hidrofóbicas y formación de enlaces cruzados estables (Alquicira-Paez, 2006; Cotter et al., 2013).

#### **2.3.6. Identificación de bacteriocinas de BAL**

Los métodos usuales para la extracción de bacteriocinas se basan en su afinidad a los disolventes orgánicos, su variación de solubilidad en soluciones salinas concentradas y a un valor de pH dado (Wescombe y Tagg, 2003). La presencia de

regiones hidrófobas de las moléculas de bacteriocina es esencial para su actividad contra las bacterias sensibles, ya que la inactivación de microorganismos por bacteriocinas depende de la interacción hidrófoba entre las células bacterianas y las moléculas de bacteriocina. Algunos bacteriocinas aparecen en su estado nativo como agregados de alto peso molecular; estos agregados pueden enmascarar parcial o completamente la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas durante su purificación y también inducir errores en la determinación de su peso molecular. Dichos complejos macromoleculares pueden desagregarse mediante el uso de agentes de disociación tal como urea o SDS, la ultrafiltración o mediante la eliminación de material lipídico mediante extracciones con solventes como metanol-cloroformo. Una vez que las bacteriocinas son recuperadas de los sobrenadantes libres de células, pueden ser concentradas mediante técnicas que permiten la separación de las fracciones de acuerdo con su tamaño y/o propiedades fisicoquímicas (Bhunja et al., 1987; Parada et al., 2007).

Cuando las bacteriocinas son secretados en el medio de cultivo, la mayoría de las estrategias tienen como primer paso comenzar con la concentración de las bacteriocinas del sobrenadante del cultivo, utilizando, por ejemplo silicato de calcio diatomita o la precipitación con sulfato de amonio, aunque estos procedimientos no proporcionan un alto grado de purificación. Por lo tanto, los pasos subsiguientes son utilizando preparaciones de enfoque isoeléctrico y/o múltiples separaciones cromatográficas, incluyendo intercambio catiónico, filtración en gel, interacción hidrofóbica y cromatografía líquida de fase reversa para lograr una purificación significativa de las bacteriocinas. Para determinar los parámetros óptimos para la producción de una bacteriocina, es necesario conocer las condiciones ideales de crecimiento de las cepas bacterianas y la composición del medio de cultivo. El medio debe contener generalmente una complejidad de nutrientes para la producción óptima de bacteriocinas, pero un alto contenido de péptidos podrían interferir en el proceso de purificación (De Vuyst y Leroy, 2007).

### **2.3.7. Purificación de bacteriocinas**

Los métodos más usados para la purificación de bacteriocinas producidas por BAL son:

1. Purificación por método convencional que está basado en la precipitación con sulfato de amonio, intercambio iónico, interacción hidrofóbica, filtración en gel y cromatografía de líquidos.
2. Protocolo de tres pasos: (i) precipitación con sulfato de amonio, (ii) extracción y precipitación con cloroformo/etanol, y (iii) cromatografía líquida.
3. Las bacteriocinas pueden ser aisladas a través de una única operación unitaria, usando un gel de interacción hidrofóbica, después maximizar la biodisponibilidad de la bacteriocina ajustando el pH del medio de fermentación crudo (De Vuyst y Leroy, 2007).

En muchos estudios reportados han utilizado diversas técnicas de cromatografía para purificar nisina, sin embargo, ya que la técnica de purificación por cromatografía es muy costosa para la producción de ingredientes alimentarios, se han propuesto nuevas técnicas de purificación de nisina. Por esto se ha propuesto la extracción de bacteriocina utilizando diferentes solventes orgánicos, tales como el tolueno y el cloroformo, no obstante estos solventes son tóxicos y su aplicación en alimentos está comprometida. Por tal razón se han propuesto alternativas como el uso de metanol y alcohol, como solventes para la obtención de nisina (Xiao et al., 2010). Xiao y colaboradores sometieron el concentrado de nisina (2.5% de nisina fue suspendida en etanol al 70%) y centrifugaron a 1520 g por 5 min, el sobrenadante fue concentrado (para evaporar el alcohol) usando un rotavapor a 90°C por 30 min, seguido por el secado por aspersión bajo las siguientes condiciones: velocidad de alimentación de 5.26 mL/min, temperatura de entrada de aire de 105°C y temperatura de salida de aire de 68°C observando que el factor de purificación fue de 5.3 con un rendimiento del 91% (metanol al 90%) y un factor de purificación de 5.5 con un rendimiento de 84.7% (etanol al 70%).



En trabajos realizados por González-Toledo y colaboradores (González-Toledo et al., 2010), sugirieron que la purificación parcial de la nisina se logra cuando el cultivo es ajustado a pH 6.0 y centrifugado a 13000 g a -4°C por 15 min. Los pellets son resuspendidos en HCl 0.1 M y ajustado a 1.5 de pH. Posteriormente llevando la muestra a tratamiento térmico (ebullición) por 10 min; seguido por centrifugación a 13000 g por 15 min a -4°C. El sobrenadante se considera como el extracto celular y es ajustado a pH de 6.5, y filtrado. También los autores liofilizaron el extracto celular para determinar la actividad de la bacteriocina obtenida y compararla con el poder de actividad de la nisina comercial, observando que de forma liofilizada el extracto celular pierde 1.6 veces su poder comparando con la nisina comercial.

En la investigación realizada por Ananou y colaboradores (Ananou et al., 2010), analizaron la aplicación de secado por aspersion al extracto de fermentación de *Enterococcus faecalis* (enterocina AS-48). Las condiciones de secado fueron: temperatura de aire de entrada: 156°C, temperatura de aire de salida (87°C), a una presión del flujo de aire de 6 Bar. El polvo obtenido fue refrigerado (5°C) y se realizaron ensayos de su estabilidad después de 8 meses de almacenamiento a -20°C, 5°C y temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo observaron que la bacteriocina después del secado por aspersion, conservó su actividad antagonista contra *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Ananou et al., 2010).

### **2.3.8. Ventajas y limitaciones del uso de bacteriocinas**

Las bacteriocinas son no-tóxicas para los humanos. Ellas han sido consumidas como productos de BAL pero su uso en alimentos como sustancias purificadas requiere de aprobación legal por las agencias reguladoras de los diferentes países. El uso de bacteriocinas en sistemas alimentarios tiene muchas ventajas sobre los conservadores tradicionales. Éstas son compatibles con muchas tecnologías de alimentos y son suficientemente estables durante el

almacenamiento. Además, no afectan las propiedades organolépticas ni sensoriales de los alimentos, no alteran las propiedades nutricionales, y son activas bajo condiciones de refrigeración y efectivas a bajas concentraciones.

Una limitación del uso de bacteriocinas está relacionada con el hecho de que su composición química y condiciones físicas del alimento pueden tener una influencia negativa en la biodisponibilidad y estabilidad de las moléculas, y por tanto, la eficacia antimicrobiana *in situ*. Esta reducción de la eficacia puede ser atribuida a la limitación de la difusión de las bacteriocinas, la unión de la sustancia antimicrobiana a grasas y/o proteínas de los componentes de los alimentos, o la inactivación por proteasas naturales del alimento. Otra importante limitante es que las bacteriocinas son generalmente activas contra bacterias Gram-positivas y no contra Gram-negativas, levaduras y hongos (Lagaron, 2012).

### **2.3.9. Producción de bacteriocinas**

La producción de bacteriocinas está asociada a la fase de crecimiento (como un metabolito primario), sin embargo, las condiciones requeridas para la máxima velocidad de crecimiento de la bacteria, no necesariamente son las óptimas para la máxima producción de bacteriocinas (Burke et al., 2013). Durante las fermentaciones para la producción de bacteriocinas los factores tales como la temperatura e incluso el pH tienen un efecto de vital importancia, por un lado se ha estudiado y ha sido demostrado que las temperaturas que favorecen la producción de bacteriocina son más bajas que las que la BAL requiere para su óptimo crecimiento, mientras que el pH del medio de crecimiento durante la fermentación puede tener un efecto importante en el rendimiento de la bacteriocina (Drosinos et al., 2005; Pongtharangkul y Demirci, 2006).

## 2.4. Procesos de fermentación en la producción de bacteriocinas

Una fermentación por lote es lo que se describe como un "sistema cerrado", mediante el cual se añaden el sustrato y producción de microorganismos en el sistema en el tiempo cero y no se retiran hasta que la fermentación se ha completado. Este es el método más simple y el comúnmente más empleado de fermentación para la producción de bacteriocinas. La optimización de la producción de bacteriocinas en la fermentación por lotes se consigue mediante la manipulación de las condiciones de crecimiento (pH, temperatura, etc.) y la composición del medio (Papagianni, 2012).

La fermentación por lotes es ideal para estudiar la producción de bacteriocinas en el laboratorio o en ensayos a pequeña escala, pero no es económicamente viable a escala comercial (Goulhen et al., 1999; Arauz et al., 2011). Por otro lado, la fermentación por lote alimentado o de alimentación discontinua, es una forma modificada de la fermentación por lote mediante el cual los sustratos que limitan el crecimiento se introducen en el fermentador a una velocidad controlada, lo cual permite un estricto control sobre la tasa de crecimiento; por ejemplo, la alimentación de carbohidratos controlados facilita una máxima tasa de crecimiento sin inhibición de sustrato que tiene un impacto en la tasa de producción de bacteriocinas. Numerosos estudios han demostrado que la producción de bacteriocinas se puede mejorar mediante el uso de lote alimentado, en lugar de fermentaciones por lote (Callewaert y Vuyst, 2000; Guerra et al., 2005; Lv et al., 2005b). Se ha estudiado a nivel laboratorio también el uso de fermentaciones continuas, sin embargo no es una estrategia comúnmente utilizada así como también las fermentaciones por lotes de ciclo repetido (RCB por sus siglas en inglés). En dichas fermentaciones RCB, las bacterias bacteriocinogénicas inmovilizadas se utilizan para realizar fermentaciones en lotes consecutivos. Después de cada ciclo de fermentación, el caldo de fermentación se reemplaza con medio fresco y el proceso se repite (Burke et al., 2013).

## **2.5. Estudios relevantes de bioactividad antagonista de sustancias antimicrobianas producidas por diversos géneros de BAL**

Con el fin de diseñar procesos industriales de producción de sustancias con actividad antimicrobiana (AaM), entre otras tecnologías se ha estudiado el cultivo sumergido de BAL usando distintas configuraciones de fermentadores bajo diversas condiciones de operación (De Vuyst y Leroy, 2007). Particularmente, las fermentaciones de BAL en biorreactor agitado mecánicamente han sido abordadas tanto en procesos por lote como lote alimentado (Zannini, 2005).

El pH y la temperatura así como la disponibilidad de nutrientes juegan un rol crucial en la producción de bacteriocinas por BAL, y la presencia de cantidades elevadas de NaCl usualmente afecta los niveles de producción. Las condiciones de cultivo tiene un efecto directo en la producción de bacteriocinas y la producción de biomasa; ésto explica el hecho de que la producción de bacteriocinas depende de la etapa fisiológica de crecimiento del organismo que las produce (De Vuyst y Leroy, 2007). La optimización de procesos de fermentación puede ser un proceso largo y complicado debido al gran número de factores que contribuyen al rendimiento de fermentación, incluyendo la formulación del medio de crecimiento, entorno del proceso, y la configuración genética del sistema de expresión y el microorganismo huésped (Oddone et al., 2007).

Para la producción masiva mediante cultivos bacterianos existen diversos factores que influyen en el crecimiento y la producción de metabolitos, tanto primarios como secundarios. La temperatura, pH, nutrientes, agitación y aireación son los factores más típicos. Especialmente, la aireación y agitación influye en el crecimiento del cultivo bacteriano y, en consecuencia, afecta a la producción de los metabolitos (Wang y Zhang, 2007). Sin embargo, el control del pH, temperatura y composición del medio de fermentación continúan siendo factores críticos que rigen la producción y la estabilidad de las bacteriocinas. El efecto de la composición del medio en la producción de bacteriocinas ha sido ampliamente

estudiado y hay acuerdo general en que el medio de Man-Rogosa-Sharp (MRS) es uno de los medios más adecuados para el crecimiento y la producción de bacteriocinas por BAL (Ghalfi et al., 2007)

Ghalfi y colaboradores (Ghalfi et al., 2007) al realizar la comparación de diferentes estrategias de fermentación (fermentaciones en matraz y en fermentadores en “lote” y “lote alimentado”), observaron que en la fermentación por lote alimentado la velocidad de alimentación del reactor con el sustrato podía mantenerse constante o se modificaba de forma exponencial en función del tiempo. Los resultados mostraron que el crecimiento celular y la actividad de la bacteriocina (4266 UA/mL) fueron influenciadas por los cambios en las concentraciones de glucosa y el complejo fuente de nitrógeno (peptona, extracto de levadura y extracto de carne). El título más alto de bacteriocina (8533 UA/mL) se obtuvo con fermentación por lote alimentado a una velocidad de alimentación variable exponencialmente. Sin embargo, los autores mencionan que la actividad de bacteriocina y la masa celular seca no siempre se correlacionan.

También se ha utilizado el suero de leche como medio de cultivo alternativo para la producción masiva de bacteriocinas en biorreactores (como la nisina, pediocina, entre otras). González-Toledo y colaboradores (González-Toledo et al., 2010) realizaron la producción de nisina a partir *utilizando* *doctis* UQ2 (aislada de queso fresco), utilizando suero dulce como medio de cultivo en un biorreactor usando un volumen de 1 L, a 200 rpm, a una temperatura de 30°C y con un pH de 6.5, con tiempo de fermentación de 12 h, observando que la actividad máxima de la nisina fue de 178 UI/mL. Sugiriendo entonces que el suero dulce puede ser usado para producir nisina por esta BAL, además de que el control del pH (6.5) durante la fermentación maximiza la producción de la bacteriocina. Por otro lado, Pérez-Guerra y colaboradores (Pérez-Guerra et al., 2005) desarrollaron la producción de pediocina en fermentación por lote-alimentado, utilizando también el suero de leche como medio de cultivo alternativo, encontrando que la BAL, bajo estas condiciones de fermentación, utiliza exhaustivamente todas las fuentes de

nitrógeno y de fósforo del medio de cultivo. El Cuadro 3 presenta un resumen de algunos trabajos importantes relacionados con la búsqueda de condiciones de fermentación convenientes para la producción de bacteriocinas. Como se ha descrito con anterioridad, la optimización de los procesos de fermentación, así como el desarrollo de medios de cultivo a base de subproductos de la industria alimentaria, ha reducido en gran medida el costo de producción de bacteriocinas por fermentación a gran escala.

**Cuadro 3.** Resumen de estudios relevantes de bioactividad antagonista de sustancias antimicrobianas producidas por diversos géneros de BAL, a través de distintas estrategias de fermentación (matraz o biorreactor), en la última década.

BAL	Condiciones de producción de actividad antimicrobiana	Microorganismo indicador	Resultados relevantes	Referencia
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC 11454,	Se usó el medio complejo: sacarosa 10-50 g/L, extracto de levadura 10 g/L, peptona de soya 10 g/L, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g/L, NaCl 2 g/L, MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.2 g/L. Los experimentos por lote se realizaron en un fermentador de 1 L inoculado al 1% (v/v) con un cultivo de <i>L. lactis</i> de 12 h, 30°C, 100 ml/min N <sub>2</sub> , y 100 rpm. El pH se controló en 6.8.  Para los experimentos por lote alimentado, una mezcla de sacarosa y NaOH fue alimentada automáticamente para mantener pH 6.75-6.85. Luego de finalizar alimentación, pH se controló a 6.8 con NaOH. Las fermentaciones duraron entre 11 y 14 h.	<i>Micrococcus flavus</i> NCBI 8166	En cultivos por lote, la concentración máxima de nisina fue de 2658 UI/mL cuando la concentración inicial de sacarosa fue de 30 g/L; mayores concentraciones de sacarosa fueron asociadas con menores concentraciones de nisina.  En los cultivos por lote alimentado basados en el control de pH, se obtuvieron las máximas concentraciones de nisina 4961, 3370 y 3498 UI/mL, cuando se mantuvieron concentraciones de sacarosa de 2, 16 y 20 g/L, respectivamente, a través de la estrategia de alimentación.	(Lv et al., 2005a)
<i>Lactobacillus lactis</i> UQ2 aislada de queso fresco	Fermentaciones por lote de 12 h, 1 L, 200 rpm, 30°C. Evaluaron distintos factores referentes al medio: suero dulce (SD), 10-20 g/L; peptona de soya (PS), 10-20 g/L; MgSO <sub>4</sub> , 0.2-0.5 g/L; MnSO <sub>4</sub> , 0.07-0.4 g/L; Tween 80, 0.04-0.2 g/L; nisina como autoinductor, 34.4-74.4 UI/mL; y operación: Q, 0-248 mL <sub>aire</sub> /min. Con base a la producción de nisina, seleccionaron las mejores condiciones, y entre éstas realizaron fermentaciones finales de 24 h manteniendo el pH constante (i.e., 5.5, 6, 6.5).	<i>Micrococcus luteus</i> NCBI 8166	De los experimentos de optimización recomiendan usar 74.4 UI/L nisina, 13.8 g/L PS y 14.9 o 5.11 g/L SD, cuya confirmación reporta 178 ± 5.2 UI/mL. Luego, con base en las condiciones seleccionadas, fermentaciones de 12 h a pH constante de 6.5 rindieron una máxima concentración de nisina de 575 ± 17 UI/mL.	(González-Toledo et al., 2010)
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> PTCC 1336	Fermentaciones en matraces Erlenmeyer con agitación orbital. Se utilizó el medio MRS. Se determinaron los valores máximos de concentración y productividad de nisina, en función de los siguientes factores: T, 27 y 30°C; agitación (N), 0, 100 y 200 rpm; edad del inóculo, 24, 32 y 40 h; tamaño de inóculo,	<i>Micrococcus luteus</i> PTCC 1169	Los máximos valores en la concentración y productividad de nisina fueron 600 UI/mL y 38 UI/(mL h), respectivamente, a las siguientes condiciones óptimas de proceso: (volumen matraz)/(volumen de medio), 5; pH inicial del medio, 8; tamaño de inóculo, 1%; edad del inóculo, 24 h;	(Tafreshi et al., 2010)

	1, 5 y 10 %; pH, 6, 7 y 8; relación (volumen matraz)/(volumen de medio), 10, 5 y 3.33. Se tomaron muestras cada 8 h.		agitación, 100 rpm, y T, 27°C.	
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> MA23, productor de la bacteriocina MA23. BAL aislada de boza, bebida fermentada de Turquía a partir de cebada, avena, mijo, maíz y arroz.	<p>Fermentaciones por lote, 1.5 L, 100 rpm, 30°C sin aireación.</p> <p>Medio base (g/L): fructosa, 5; ácido ascórbico, 0.5; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 19; MgSO<sub>4</sub>, 0.25.</p> <p>Estudiaron el efecto del pH y distintas fuentes de carbono (lactosa, glucosa, sacarosa, maltosa) y nitrógeno (extracto de levadura, extracto de carne, peptona de soya, triptona, extracto de malta) sobre la actividad antimicrobiana producida.</p>	15 microorganismos Gram negativos fueron sensibles, de los géneros <i>Lactococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pediococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> y <i>Enterococcus</i> .	Lograron máximas actividades bacteriocina de 6,500-13,000 UA/mL a edades del cultivo entre 5 y 10 h, proponiendo condiciones óptimas con pH de 6.5 y concentraciones de sacarosa y extracto de levadura de 0.5 y 1% respectivamente.	(Akkoç et al., 2011)
<i>L. lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>  ATCC 11454	<p>Fermentaciones por lote, 1.5 L, usando como medio de producción leche descremada diluida al 25% en agua.</p> <p>Los experimentos se realizaron a 30°C por 56 h y: a) 200 rpm; 0, 0.5, 1.0 y 2.0 L<sub>aire</sub>/min; b) 100 rpm; 0 y 0.5 L<sub>aire</sub>/min). El pH evolucionó libremente.</p>	<i>Lactobacillus sakei</i> ATCC 15521. La actividad de nisina se evaluó por difusión en agar.	La máxima concentración de nisina fue de 49.88 mg/L (3.3 log UA/mL o 1,995.29 UA/mL) y se obtuvo a las 16 h a 200 rpm, sin inyección de aire (k <sub>LA</sub> =5.29×10 <sup>-3</sup> h <sup>-1</sup> ).	(Arauz et al., 2011)



## 2.6 Métodos para determinar la actividad antimicrobiana

Existe una amplia variedad de métodos para determinar la eficacia de los compuestos antimicrobianos. Esto dificulta la comparación de los resultados de distintos laboratorios y también más complejo para determinar su uso potencial en alimentos debido a que estos métodos son inapropiados o de escasa significancia. El método de difusión en agar es ampliamente usado para la cuantificación de actividad antimicrobiana o para un barrido de sustancias antimicrobianas, también referido como el ensayo de disco (Lagaron, 2012). Algunos métodos utilizados con frecuencia son: 1) Antagonismo directo y simultáneo. La bacteria indicadora se añade al agar templado pero fluido y se preparan placas. Luego, la BAL de interés es sembrada superficialmente y los cultivos son incubados. Después, las cajas son examinadas buscando zonas de inhibición alrededor de las colonias desarrolladas. 2) Prueba diferida antagonista: las cepas productoras e indicadoras crecen separadamente en medios y condiciones óptimas (tiempo, temperatura, y atmósfera). El cultivo de prueba es inoculado en la superficie de un medio sólido y se incuba. Luego, el cultivo indicador es mezclado con agar fluido que es vertido sobre el cultivo del microorganismo de prueba. Tras la reincubación, la inhibición se considera positiva en zonas claras alrededor de colonias de la cepa productora. 3) Difusión en agar. En caja Petri con agar solidificado se colocan cilindros estériles y se adiciona agar templado fluido (previamente inoculado con la cepa indicadora) y se deja solidificar, posteriormente se retiran los cilindros. En los pozos formados se adiciona la sustancia antimicrobiana (sobrenadante), ajustada a pH neutro, seguida por la difusión en el agar. Después de la incubación, se examinan las zonas de inhibición de las cajas (halos de inhibición).

La actividad de las bacteriocinas puede ser expresada de distintas maneras, incluyendo el uso de unidades arbitrarias (UA) por mililitro (UA/mL). Por ejemplo, Parente y colaboradores (Parente et al., 1995) definen el título de bacteriocinas en (UA/mL) como 100 D, donde D es el factor de dilución. En contraste, Villani y colaboradores (Villani et al., 2001) definen una unidad arbitraria (UA) como el

recíproco de la máxima dilución del sobrenadante de caldo de fermentación de BAL, que da lugar a una zona de inhibición del microorganismo indicador en medio sólido.

El método de la dilución crítica para expresar la actividad microbiana, es un procedimiento usado frecuentemente para cuantificar la actividad de las bacteriocinas en medio sólido. En la técnica “spot on the lawn” (puesto sobre la superficie) se hacen una serie de diluciones base 2 de la muestra (bacteriocina) y gotas uniformes (5-10  $\mu$ L) son puestas sobre la superficie de agar que contiene el microorganismo indicador. Después, bajo condiciones estandarizadas de incubación son examinadas las cajas con inhibición. El título de bacteriocina en unidades arbitrarias por mililitro (UA/mL) son expresadas como el recíproco de la dilución más alta de las diluciones base 2 que muestran una zona clara de inhibición sobre la superficie del microorganismo indicador, multiplicado por el factor de dilución (1 mL dividido entre el volumen de la gota). Aunque es una técnica usada por diversos autores, el procedimiento para el cálculo de las unidades arbitrarias está basado en escalas geométricas discontinuas, en los cuales los errores visuales subjetivos deben ser considerables (Nuñez et al., 1996)

## **2.7. Bioutilización de residuos de la industria alimentaria como medios de producción de BAL y sus bacteriocinas**

Para la producción masiva de BAL y sus bacteriocinas (incluida la nisina) se han realizado trabajos de investigación usando medios de cultivo utilizando residuos de la industria alimentaria, tal es el caso del uso brotes de vid como fuente de carbono y de las vinazas como fuente de nitrógeno, fósforo, y micronutrientes para el desarrollo de *Lactococcus lactis*; resultando una alternativa de medio de producción económica para la producción de ácido láctico y biosurfactantes (Rodríguez et al., 2010). Al igual que los residuos de la industria del vino, otros investigadores han estudiado el uso de suero de leche como medio de cultivo alterativo (Amiali et al., 1998). González-Toledo y colaboradores (González-Toledo et al., 2010), para otorgarle un valor agregado a este residuo de la industria

alimentaria y además reducir el costo de producción de bacteriocinas, mostraron que la peptona de soya suplementada con suero dulce, usados como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente, promueve la alta producción de nisina y además una actividad óptima de la nisina de 180 UI/mL. Por su parte, Wolf-Hall y colaboradores (Wolf-Hall et al., 2009) sugirieron el uso de sólidos presentes en las vinazas de la destilación del maíz para producir etanol (SDM) y de lactosuero como medios de cultivo de bajo costo, reportando un 93% de reducción de costos y actividades de nisina de 230 UI/mL (lactosuero) y 255 UI/mL (SDM). También Arauz y colaboradores (Arauz et al., 2011) realizaron un estudio para la producción de nisina utilizando la fermentación por lote, empleando suero de leche como medio de cultivo alternativo, encontrando que el medio de cultivo compuesto por suero de leche, no filtrado, otorga a *L. lactis* los nutrientes necesarios para su mejor adaptación y producción de nisina. En el caso específico del lactosuero, su manejo y disposición sigue siendo un problema en la industria alimentaria (Carvalho et al., 2013) a pesar de los diversos reportes que sugieren su uso en distintos bioprocesos (i.e., producción de ácidos orgánicos, proteína, enzimas, etanol y bacteriocinas (Panesar et al., 2007; Pescuma et al., 2008; Prazeres et al., 2012; Garsa et al., 2014).

El lactosuero es el mayor contaminante residual producido en la industria quesera; sus características dependen sobre todo de la calidad de la leche empleada (i.e., cabra, vaca, oveja o búfala) la cual varía dependiendo de la alimentación, la salud y el estadio de lactación del animal. El volumen de efluente producido por la industria manufacturera incrementa con la producción de queso. En este contexto se puede referir que para la producción de 1 kg de queso son necesarios 10 kg de leche, originando 9 kg de lactosuero. A nivel mundial son producidas  $40.7 \times 10^6$  Ton de lactosuero por año (Prazeres et al., 2012).

El lactosuero es un líquido amarillento resultado de la precipitación y remoción de la caseína de la leche en la producción del queso, este color está dado por la riboflavina (vitamina B<sub>2</sub>). La mayoría de la lactosa de la leche, 39-60 kg m<sup>-3</sup>

constituye la fracción principal (90%) de la carga orgánica en el lactosuero. Los contenidos de grasa y proteína también son responsables parcialmente de la contaminación orgánica, con valores en el rango de 0.99 – 10.58 kg m<sup>-3</sup> y 1.4- 8.0 kg m<sup>-3</sup>, respectivamente. La contaminación inorgánica por lactosuero es atribuida a la presencia de sales minerales (0.46-10%), principalmente NaCl y KCl (>50%) y sales de calcio (primordialmente fosfatos) (Prazeres et al., 2012). En este contexto los principales componentes tanto del suero dulce como del suero ácido, después del agua, son lactosa (70-72% de los sólidos totales), las proteínas del suero (como son  $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoglobulina, inmunoglobulinas, proteasas y enzimas nativas) que representan del 8-10% y los minerales (12-15%). Por lo anterior, el lactosuero se ha empleado para numerosos procesos biotecnológicos por sus altos contenidos en lactosa, además por su contenido de minerales, vitaminas y proteínas solubilizadas en agua para la producción de otros productos, tales como el ácido láctico (Panesar et al., 2007; Carvalho et al., 2013).

Los requerimientos nutricionales de las BAL y especialmente en las fuentes de nitrógeno son complejas, los medios de cultivo de alto contenido en proteína, son usualmente suplementados con extracto de levadura o lisados proteicos (peptonas). Por otra parte la adición de manganeso es importante en las fermentaciones controladas, por su rol como constituyente de lactato deshidrogenasa (Panesar et al., 2007).

La producción por lote de BAL utilizando lactosuero presenta ciertas desventajas tales como largos periodos de la fase lag y el uso de volúmenes grandes para incrementar la producción, usualmente en tiempos de fermentación largos que incrementan los costos de operación. En contraste los procesos continuos tienen la ventaja de grandes productividades y no requieren de fermentadores de grandes volúmenes (Panesar et al., 2007).

En México, la producción de leche es de ~10,100 millones de toneladas. El suero producido en México es de cerca de 1 millón de toneladas y contiene 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. A pesar de esta riqueza

nutricional, potencialmente utilizable, el 47% de lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación (Valencia-Denicia y Ramírez-Castillo, 2009). De acuerdo con González-Toledo y colaboradores, en el 2008 en México se estimó una producción de 478,215 toneladas de suero (González-Toledo et al., 2010).

También se han utilizado melazas, subproducto de la industria azucarera, para la producción tanto de BAL como de sus metabolitos (ácido láctico, bacteriocinas, etc.) por su alto contenido en azúcares, generalmente 50% (v/v) lo que hace a este subproducto muy apropiado para diversas fermentaciones (Wee et al., 2004; Dumbrepatil et al., 2007)

## 2.8. Salud mundial

Las enfermedades causadas por el consumo de alimentos contaminados han tenido un impacto económico y público a nivel mundial. En el 2004 los datos de FoodNet (<http://www.cdc.gov/foodnet/>) mostraron una disminución en la incidencia de infecciones causada por patógenos presentes en los alimentos tales como *Campylobacter*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Listeria*. Sin embargo, es importante resaltar que muchas enfermedades causadas por alimentos son esporádicas y no se contabilizan como parte de un brote. Las enfermedades causadas por *Campylobacter* y *Salmonella* son las reportadas mayormente, sin embargo, patógenos tales como *Listeria monocytogenes* pueden adaptarse para sobrevivir y crecer en condiciones ambientales adversas y causar listeriosis (Gandhi y Chikindas, 2007). Los miembros de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO por su siglas en inglés; <http://www.fao.org>) y de la Organización Mundial de la Salud (WHO por su siglas en inglés; <http://www.who.int>) 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 en los alimentos.

### **2.8.1. Patógenos en alimentos: Contaminación primaria y sus causas**

La mayoría de los decesos están asociados a bacterias patógenas zoonóticas (de origen animal) como lo son *Salmonella* spp., *Escherichia coli* y *Campylobacter jejuni* transmitidas por animales sanos a una amplia variedad de alimentos. Otros patógenos tales como *Listeria monocytogenes* están ampliamente distribuidas en el ambiente o son parte de la microbiota natural de los humanos tales como *Staphylococcus aureus*. En estos dos últimos casos, la contaminación de los alimentos ocurre como resultado de falta de prácticas higiénicas en el procesamiento de los alimentos (Lagaron, 2012).

Los animales de granja normalmente adquieren los peligros microbianos, como resultado de la transmisión horizontal de su entorno. Las principales fuentes son otros animales, agua contaminada, y fauna tales como pájaros y roedores. Esta transmisión horizontal puede ser exacerbada por la producción de cría intensiva, que promueve la sobrepoblación e interfiere con el mantenimiento de una higiene adecuada a la que los animales son sometidos en muchas granjas. Finalmente, los productos derivados de animales infectados, pueden llegar al consumidor en algún momento.

La creciente incidencia de enfermedades transmitidas por microorganismo en alimentos, ha centrado la atención en las fuentes de contaminación. Dado que los productos de origen animal han sido directamente responsables de más del 50% del total de los brotes de origen alimentario en la década de los 1990's, el énfasis se ha prestado a este tipo de productos como la carne, pollo, huevos y leche. Por otro lado en los últimos años, la demanda de frutas y hortalizas frescas ha aumentado en los países industrializados como consecuencia de la toma de conciencia de los beneficios para la salud asociados con el consumo de productos frescos. Por tanto, hoy en día los brotes de enfermedades transmitidas por

alimentos se han incrementado probablemente porque los cultivos en el campo pueden estar contaminados con agentes patógenos transportados por animales de granja y de los seres humanos. Los principales factores de riesgo incluyen la proximidad a los pozos de riego y vías fluviales superficiales expuestos a las heces de ganado y la vida silvestre de exposición, en los campos a los animales salvajes, y sus materiales de desecho, y estiércol compostado incorrectamente utilizado como fertilizante. Aunque la frecuencia de brotes de origen alimentario en enfermedades gastrointestinales asociados con las frutas y hortalizas parece ser bajo en comparación con los productos de origen animal, alimentos listos para comer, como frutas y verduras que requieren un mínimo o ningún procesamiento adicional antes de su consumo han sido implicados como vehículos de transmisión de microorganismos infecciosos. Aún más, enfermedades transmitidas por alimentos asociados con frutas y verduras parecen ir en aumento en muchos países debido principalmente al aumento de la distribución mundial de alimentos (Lagaron, 2012).

### **2.8.2. *Listeria monocytogenes***

*Listeria* es un patógeno psicrótrofo Gram-positivo, que tiene la habilidad de adaptarse a un amplio rango de condiciones y capaz de multiplicarse en ambientes hasta unos pocos grados por debajo de 0°C. Puede crecer entre pH 4.6 y 9.5 y a una actividad de agua de sólo 0.92 (Gandhi y Chikindas, 2007; Carpentier y Cerf, 2011).

*Listeria monocytogenes* puede ser encontrada en una amplia variedad de alimentos crudos y procesados. Leche y derivados como quesos blandos, carne y productos cárnicos tales como carne de res, de puerco, embutidos, productos frescos como mariscos, pescado, entre otros (Gandhi y Chikindas, 2007). Se encuentra condiciones favorables de crecimiento en pisos, drenajes y equipos dentro de las instalaciones de la industria alimentaria, especialmente en el

ambiente frío y húmedo de las cámaras de refrigeración donde bacterias psicrótroficas pueden sobrevivir (Carpentier y Cerf, 2011).

Básicamente *Listeria monocytogenes* es un patógeno oportunista que casi siempre afecta a personas con una enfermedad o circunstancias subyacente grave (i.e. inmunodepresión, afecciones crónicas, como la cirrosis, que producen inmunodeficiencia); a mujeres embarazadas; a fetos y recién nacidos; y a personas mayores. *L. monocytogenes* está ampliamente extendida por el ambiente y en los alimentos (Gandhi y Chikindas, 2007). La listeriosis, tiene como características importante que el patógeno puede multiplicarse a temperaturas de refrigeración hasta alcanzar cifras significativas. Aunque la listeriosis es una enfermedad poco común, su gravedad y el hecho de que esté asociada a alimentos de elaboración industrial, la sitúan entre las enfermedades transmitidas por alimentos de mayor relevancia social y económica. Actualmente, la FDA (Agencia de Alimentos y Medicamentos de EUA por sus siglas en inglés) tiene una política de cero-tolerancia para *L. monocytogenes* en “alimentos listos para comer”. La listeriosis transmitida por alimentos es una enfermedad relativamente poco común, pero grave, con tasa de letalidad altas (20-30%), comparadas con las de otros microorganismos patógenos transmitidos por los alimentos, como la *Salmonella*.

## 2.9. Bacteriocinas como prospecto de bioconservación en alimentos

Se ha dado el término de bioprotección a la conservación de alimentos usando su propia microbiota natural y/o sus metabolitos antimicrobianos, diferentes a la preservación con agentes artificiales (químicos). Los cultivos antagonistas adicionados a alimentos para inhibir patógenos y/o extender su vida media mientras que van cambiando sus propiedades sensoriales son llamados cultivos protectores. El principal propósito de la bioconservación es la extensión de la vida de almacenamiento así como también la mejora de la seguridad alimentaria. Las BAL tienen un potencial uso en la bioconservación porque su consumo es seguro



y son la microbiota predominante de muchos alimentos. Las BAL son consideradas GRAS (“reconocidas generalmente como seguras” por sus siglas en inglés) debido a su asociación típica con la fermentación de alimentos y su larga tradición como bacterias grado alimenticio. Además, los péptidos antimicrobianos producidos por BAL pueden ser fácilmente descompuestos por proteasas digestivas, entonces éstas no producen alteración en la microbiota intestinal. Las BAL pueden ejercer un efecto bioprotector o inhibitorio contra otros microorganismos como resultado de la competición por nutrientes y/o la producción de bacteriocinas o de otros compuestos antagónicos tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno y enzimas. Entre los cultivos iniciadores se pueden encontrar los que tienen una actividad metabólica fundamentalmente (producción de ácidos, hidrólisis de proteínas) y los que aseguran una acción antimicrobiana, principalmente (Castellano et al., 2008). Los procesadores de alimentos se enfrentan a un reto importante con los consumidores que demandan alimentos sanos con una vida útil larga, pero también expresan su preferencia por los productos mínimamente procesados, menos dañados por el calor y la congelación y no contiene conservantes químicos. Por lo tanto, las bacteriocinas aparecen como una opción atractiva para proporcionar al menos parte de la solución (Castellano et al., 2008).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

La demanda creciente por parte de los consumidores por adquirir alimentos con el procesamiento mínimo y menor uso de aditivos y conservadores químicos, pero que conserven sus cualidades sensoriales y estén libres de patógenos, ha tenido como respuesta la utilización de inhibidores alternativos de fuentes naturales, tanto microbianas como vegetales, entre otras, que promuevan la seguridad alimentaria. Específicamente, el uso de bacteriocinas en alimentos es una práctica útil como alternativa de conservación, por sus cualidades bactericidas y bacteriostáticas contra microbios deterioradores y patógenos presentes en alimentos, además de ser no tóxicas para las personas y ser compatibles y estables durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. Es por esto que en la industria alimentaria sigue siendo de interés la búsqueda de nuevas bacteriocinas, nuevos microorganismos productores de éstas (principalmente BAL) así como el mejoramiento de los procesos de fermentación para la producción de bacteriocinas, lo cual implica aspectos relativos a condiciones de operación y formulación de medios de cultivo, entre otros. Por otra parte, la producción de BAL y sus bacteriocinas es un proceso fastidioso debido a la necesidad de usar medios de cultivo ricos en nutrientes, tales como carbohidratos, minerales, vitaminas y, en algunos casos, aminoácidos, proteínas o hidrolizados proteicos. En estudios a nivel laboratorio, las BAL son comúnmente cultivadas en medios como MRS y M17, pero a gran escala este tipo de medios resultan muy caros. Así, la búsqueda de medios más económicos puede promover un mayor uso comercial de bacteriocinas en alimentos procesados (Arauz et al., 2011).

Por otra parte, en México la producción de lactosuero es de cerca de 1 millón de toneladas involucrando 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. A pesar de esta riqueza nutricional, potencialmente utilizable, el 47% del lactosuero es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema

serio de contaminación. Es por esto que, para otorgar un valor agregado a este subproducto de la industria láctea, en el presente trabajo se ha planteado su uso como ingrediente importante (i.e., fuente de carbono y nitrógeno) para la formulación de medios de cultivo alternos para la producción de sustancias con actividad antimicrobiana a partir de una BAL, aislada de pozol, en biorreactor agitado mecánicamente.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. Objetivo General**

Evaluar condiciones de operación en la producción de sustancias con actividad antimicrobianas a partir de bacterias ácido lácticas nativas cultivadas en biorreactor, usando suero de leche como medio de cultivo base.

### **4.2. Objetivos Específicos**

1. Determinar condiciones adecuadas (i. e., composición de medio de cultivo a base de lactosuero, pH, velocidad de agitación, temperatura y tiempo de incubación) para la producción de biomasa de BAL y actividad antimicrobiana, contra *Listeria monocytogenes*, en fermentaciones a nivel de matraz agitado orbitalmente.
2. Usando el medio de cultivo y condiciones básicas determinadas en el objetivo anterior, determinar el efecto de dos condiciones de aireación: microaerobiosis (0 Laire/min) y aerobiosis (1 Laire/min), en la producción de sustancias antimicrobianas mediante el cultivo de bacterias ácido lácticas en biorreactor por lote, usando el medio de cultivo y condiciones básicas determinadas en el objetivo anterior.

## 5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de bacteriocinas en alimentos es una práctica útil como alternativa de conservación, por sus cualidades bactericidas y bacteriostáticas contra microorganismos patógenos y de descomposición de alimentos, además de ser no tóxicos para las personas y ser compatibles y estables durante el procesamiento y almacenamiento de los alimentos. La producción de BAL y sus bacteriocinas es un proceso fastidioso debido a la necesidad de usar medios de cultivo ricos en nutrientes, tales como carbohidratos, minerales, vitaminas y, en algunos casos, aminoácidos, proteínas y/o hidrolizados proteicos. En estudios a nivel laboratorio, las BAL son frecuentemente cultivadas en MRS y M17; no obstante, en procesos a gran escala el uso de estos medios no es recomendable debido a los altos costos involucrados. Así, existe una búsqueda permanente de medios de cultivo alternativos, eficientes y de menor costo, para promover el uso comercial de bacteriocinas. Con el fin de diseñar procesos de producción de sustancias con actividad antimicrobiana (AaM), entre otras tecnologías se ha estudiado el cultivo sumergido de BAL usando distintas configuraciones de fermentadores bajo diversas condiciones de operación. Particularmente, las fermentaciones de BAL en biorreactor agitado mecánicamente han sido abordadas tanto por lote como lote alimentado.

En la industria alimentaria sigue siendo de interés la búsqueda de nuevas bacteriocinas así como el diseño o mejoramiento de los procesos de fermentación para su producción, involucrando especialmente el uso de bacterias ácido lácticas nativas. Por tanto, el presente trabajo tiene como propósito estudiar la producción de actividad antimicrobiana de la BAL1, *Streptococcus* sp. aislada de pozol - bebida fermentada tradicional mexicana-, en procesos de fermentación por lote, explorando los efectos de distintas condiciones de operación, incluyendo el uso medios de cultivo alternativos. Por otro lado, a pesar de la riqueza nutricional

potencialmente utilizable del lactosuero, este residuo de la industria láctea no es del todo aprovechado, en México el 47% es descargado al drenaje y llega a ríos y suelos, causando un problema serio de contaminación; cerca de 1 millón de toneladas son descargadas conteniendo 50 mil toneladas de lactosa y 5 mil toneladas de proteína. Es por esto que, para otorgar un valor agregado a este subproducto, se ha planteado su uso como medio de cultivo base para la producción de sustancias con actividad antimicrobiana a partir de BAL1, aislada de pozol, en biorreactor agitado mecánicamente.

## **6. HIPÓTESIS**

Es posible usar lactosuero como ingrediente importante de medios de cultivo alternos para soportar el crecimiento de *Streptococcus* sp. –denominada BAL1-, aislada de pozol, y la producción de sustancias antimicrobianas. La actividad antimicrobiana (AaM) lograda será eficaz contra organismos patógenos indicadores, de importancia en la industria de los alimentos, lo que dará cuenta de la potencial aplicación de las sustancias antimicrobianas producidas.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1. Microorganismos**

#### **7.1.1. Microorganismo productor de actividad antimicrobiana: BAL1.**

Para producir agentes con actividad antimicrobiana se utilizó la BAL1 proporcionada por la Dra. Gloria Díaz Ruíz de la Facultad de Química (FQ) de la UNAM, dicha cepa pertenece a la colección de bacterias lácticas aisladas del pozol (Tavera-Montes, 2010). La BAL1 fue conservada a -80°C, en viales de 2 mL en 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de cultivo de BAL1 incubada previamente en caldo MRS (BD Difco®) (Mendoza-Mendoza, 2012). Para la activación de BAL1, el abasto de conservación fue inoculado (1% v/v) en 5 mL de caldo estéril MRS (BD Difco®) dándole un periodo de incubación de 24 h a 30°C.

#### **7.1.2. Microorganismo indicador: *Listeria monocytogenes***

La cepa de *L. monocytogenes* fue proporcionada por el cepario de la FQ-UNAM a través de la Dra. Gloria Díaz Ruíz, estando registrada con la clave CFQ-B-104 (diversos métodos moleculares y bioquímicos han corroborado la identidad de la cepa) se conservó a -80°C, en viales de 2 mL en 0.3 mL de glicerol y 1.3 mL de cultivo de *L. monocytogenes* en caldo BHI (Bioxon®). Para la activación de *L. monocytogenes*, el abasto conservado fue inoculado (1% v/v) en 5 mL de caldo estéril BHI (Bioxon®) dándole un periodo de incubación de 24 h a 35°C.

### **7.2. Medios de cultivo**

**Caldo MRS** (Difco®) medio de referencia usado para el cultivo de la BAL1 y producción de su actividad antimicrobiana (De Man et al., 1960).

En la primera etapa de esta investigación se evaluaron diferentes medios de cultivo para la producción de BAL1 a nivel matraz, formulando estos medios de acuerdo con un balance de materia, teniendo como base el contenido de Nitrógeno y Carbohidratos del medio MRS. Se propusieron tres medios de cultivo



alternativos: **Medio MCA-I** (50% MRS y 50% Lactosuero en polvo), **Medio MCA-II** (Medio APT (Evans y Niven, 1951) (Peptona de caseína (1% p/v), Extracto de levadura (0.5% p/v),  $K_2HPO_4$  (0.5% p/v), Citrato de sodio (1.2% p/v), NaCl (1.2% p/v), Dextrosa Anhidra (1% p/v),  $MgSO_4$  (0.08% p/v),  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.1% p/v),  $FeSO_4$  (0.004% p/v), Tween 80 (0.3% p/v) y Lactosuero en polvo (1% p/v).

**Medio MCA-III** (Melaza 4% p/v, Extracto de levadura 0.5% p/v, Caldo de soya tripticaseína (2% p/v), Solución concentrada de  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$  (0.1 % v/v) y Tween 80 (0.3% p/v)).

Todos los medios se prepararon con agua desionizada y fueron esterilizados a 15 psig durante 15 min en autoclave Tuttnauer 3545 E. Para las fermentaciones a nivel biorreactor, el medio MCA-II, fue esterilizado a 15 psig durante 60 min en autoclave Felisa FE-399, México.

### **7.3. Fermentación por lote nivel matraz**

#### **7.3.1. Producción de sustancia antimicrobiana**

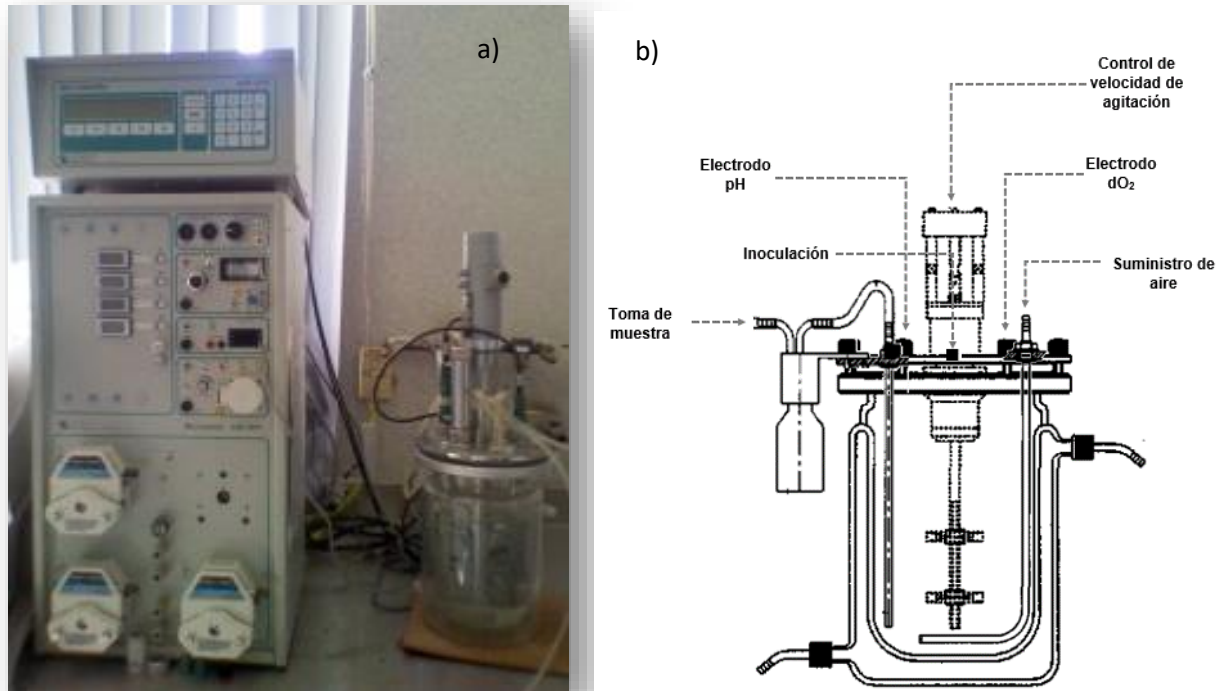
Después del periodo de incubación de 24 h a 30°C, la BAL1 activada se inoculó (1% v/v) en 500 mL de cada uno de los medios por probar. El contenido de cada caldo inoculado se dividió en dos matraces Erlenmeyer de 1 L incubándose a 30°C en una incubadora refrigerada (Max Q 5000) con agitación orbital de 150 rpm, para favorecer tanto la producción de biomasa como la de actividad antimicrobiana. Cada fermentación fue monitoreada durante 24 h con muestreos a las 0, 12 y 24 h; el volumen de cada muestra fue de 60 mL (40 mL para análisis de actividad antimicrobiana, conservándose en ultracongelación (-80°C) (REVCO modelo ULT 1386-3-A35) antes de su procesamiento). El caldo de fermentación colectado fue centrifugado a 5,500 rpm y 4°C durante 30 min (centrífuga Hermle z323k) para separación de células microbianas. Al sobrenadante obtenido (60 mL) se le ajustó el pH a  $6.5 \pm 0.2$  con una solución de NaOH 5N, para evitar la interferencia del ácido láctico en las pruebas de actividad antilisteria. Una vez

ajustado el pH, los 60 mL de caldo fueron concentrados en un rotavapor con controlador de vacío (BÜCHI R-215; 60°C a 35 rpm; 72 mbar) hasta un volumen de 24 mL. Luego, para inactivación de proteasas, al concentrado obtenido se le dio un tratamiento térmico durante 10 min a 110°C; finalmente, una vez frío éste fue conservado a -80°C para el análisis posterior de actividad antimicrobiana.

#### **7.4. Fermentación por lote nivel biorreactor**

Después del periodo de incubación (24 h a 30°C), 24 mL de caldo de BAL1 en MRS fueron inoculados (1% v/v) por inyección en un biorreactor MTB autoclavable de 3 L (Applikon Biotechnology) (Figura 3a) y el proceso de fermentación fue realizado con las siguientes condiciones de operación: volumen de operación 2.4 L de Medio MCA-II (pH inicial de  $6.7 \pm 0.2$ ), 30°C (control mediante baño recirculador PolyScience), agitación a 200 rpm (2 turbinas Rushton de 45 mm de diámetro), evaluando dos condiciones de aireación, 0 L/min y 1 L/min.

El biorreactor fue armado incluyendo electrodos de pH y oxígeno disuelto insertos en la tapa superior, los cuales fueron calibrados antes de la esterilización del medio *in situ*. El flujo de aire, pH, oxígeno disuelto y temperatura fueron monitoreados y controlados con una bioconsola (Bio Controller ADI-1030) acoplada a una PC usando el software BioXpert (Versión 1.1x). En la Figura 3b se muestra un esquema del fermentador. Cada condición de fermentación fue realizada por triplicado.



**Figura 3.** a) Fotografía de biorreactor MTB autoclavable de 3L (Applikon Biotechnology) y b) Esquema del biorreactor exhibiendo algunos elementos importantes como septo de inoculación, toma de muestra, electrodos de pH y dO<sub>2</sub>, suministro de aire y sistema de agitación.

### 7.5. Determinación de la concentración de biomasa (X)

Para cada tiempo, a los pellets colectados de la centrifugación de caldo de fermentación se les realizaron dos lavados: el sedimento fue resuspendido en solución isotónica (0.9% NaCl) y centrifugado (5,500 rpm durante 30 min a 4°C); el sobrenadante se decantó en cada lavado. Los tubos de centrifuga (CORNING® 50 mL) con el pellet se llevaron a un horno de convección a 100°C durante 24 h, hasta peso constante (g). Luego, los tubos fueron lavados y puestos en horno de

convección a 100°C hasta peso constante sin biomasa. La concentración de biomasa de BAL1 se calculó con 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 vacío (g),  $P_{t+x}$  es el peso del tubo con biomasa (g) y  $V_m$  es el volumen de la muestra (L). Estos datos se graficaron en función del tiempo, en formato semilogarítmico, obteniéndose la pendiente y siendo ésta considerada la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ).

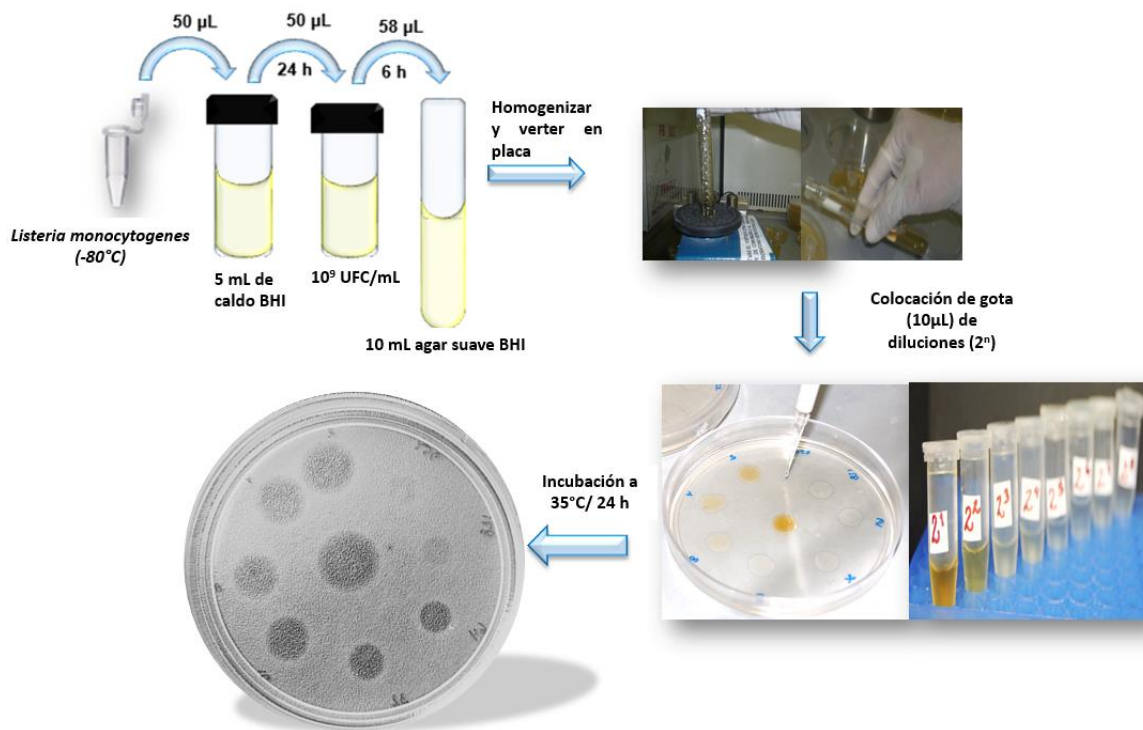
## 7.6. Evaluación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó mediante de técnica de difusión en agar (Nuñez et al., 1996). Se inició la prueba con la activación de *L. monocytogenes* (Lm), inoculando 50  $\mu\text{L}$  de abasto de conservación Lm en 5 mL de BHI, llevando a incubación a 35°C por un periodo de 24 h; posteriormente, se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de este caldo para inocular 5 mL de caldo BHI estéril e incubar por 6 h a 35°C (esto resulta en un cultivo de Lm en fase log, con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/mL). Luego, 58  $\mu\text{L}$  de este último caldo de fermentación fueron inoculados en 10 mL de agar fundido BHI (37 $\pm$ 2°C) el cuál posteriormente fue vertido sobre una caja Petri estéril; una vez solidificado el agar inoculado con listeria se realizó la prueba de difusión en agar por gota, como se indica en el siguiente apartado. Posteriormente las cajas fueron incubadas a 35°C durante 24 h; transcurrido el tiempo de incubación se midieron los halos de inhibición usando un vernier Fowler. Esto se realizó por duplicado para cada muestra tomada durante las fermentaciones.

### 7.6.1. Prueba de difusión en agar por gota (método de la dilución crítica)

Se usaron nueve microtubos estériles Eppendorf® de 2 mL, de los cuales a ocho se les agregaron 500  $\mu\text{L}$  de agua; al primer tubo se le colocó 1 mL de caldo concentrado (dilución  $2^0$ ), después fueron tomados 500  $\mu\text{L}$  de concentrado y se

colocaron en el segundo tubo (que contenía agua estéril), homogenizando posteriormente y obteniendo así una dilución  $2^1$  de concentrado. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, siguiendo el paso anterior diluyendo el concentrado hasta  $2^8$ . Luego, se depositaron  $10 \mu\text{L}$  de cada dilución sobre el agar suave BHI solidificado (descrito en la sección 7.6), en la periferia y depositando el concentrado ( $2^0$ ) en el centro. Las gotas se dejaron en reposo en una campana de flujo laminar durante 40 min para posteriormente incubar la caja a  $35^\circ\text{C}$  durante 24 h. La actividad antimicrobiana se reportó en Unidades de Actividad (UA) por mL de caldo de fermentación. En cada ensayo se consideró una actividad unitaria, en UA, en la máxima dilución en la cual se obtiene un halo claro de inhibición de Lm.



**Figura 4.** Procedimiento para la realización de la prueba de gota (método de la dilución crítica)

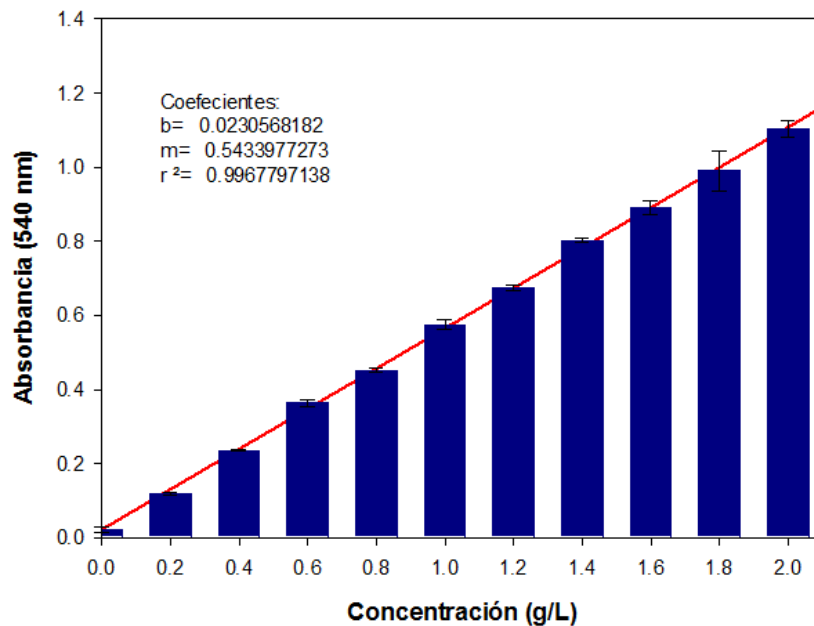
### **7.7. Determinación de azúcares reductores totales por el método 3,5-Dinitrosalicílico (DNS)**

La concentración de carbohidratos en el caldo de fermentación se determinó por el método colorimétrico DNS, que permite conocer la concentración de monosacáridos reductores libres (Miller, 1959). Para cuantificar los azúcares reductores en cada muestreo se colectaron 20 mL de caldo de fermentación cada vez. La muestra se centrifugó a 5,500 rpm a 4°C en una centrífuga Hermle z323k; posteriormente el sobrenadante fue separado del pellet de biomasa y almacenado en ultracongelación (-80°C) (REVCO modelo ULT 1386-3-A35) para su posterior análisis. El sobrenadante se descongeló y se hizo una dilución 1:100 para determinar los azúcares reductores presentes en cada tiempo de muestreo.

El reactivo DNS se preparó de la siguiente manera: en un vaso de precipitados de 1000 mL se disolvieron 5 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico (Sigma) y 150 g de tartrato de sodio y potasio (J.T. Baker) en 350 mL de agua con agitación constante. Posteriormente, en un matraz aforado de 500 mL, la solución preparada se mezcló con 100 mL de NaOH 2N, aforándose con agua desionizada. El reactivo se guardó en un frasco con tapa de rosca color ámbar y se forró de aluminio para su protección de la luz.

Para calcular los azúcares se realizó una curva patrón a partir de glucosa al 0.2% (2 g en 1000 mL de agua destilada). Se prepararon 200 mL de la solución de glucosa al 0.2% y se realizaron las diluciones a concentraciones conocidas que fueron de 0.2 g/L hasta 2.0 g/L. De cada concentración se tomaron 500 µL y se colocaron en tubos de ensaye de 8 mL, agregándose 500 µL del reactivo DNS. Los tubos fueron calentados en baño maría (Water Bath, BÜCHI) a ebullición por 5 min, enfriándose posteriormente en agua con hielo. Finalmente se agregaron 5 mL de agua destilada y se homogenizaron perfectamente; 700 µL de muestra fueron colocados en celdas de cuarzo y se procedió a tomar la lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Este parámetro es proporcional a la concentración de glucosa, fructosa o una concentración

equimolar de ambos en un rango de 0 a 2 g/L. En la Figura 5 se muestra la curva de calibración obtenida.



**Figura 5.** Curva de calibración método DNS a base de dextrosa.

### 7.8. Determinación de ácido láctico

La producción de ácido láctico fue medida por titulación con NaOH 0.1 N (González-Toledo et al., 2010), expresando la acidez en gramos de ácido láctico por litro, para lo cual se colocaron 3 mL de caldo de fermentación en matraces Erlenmeyer de 25 mL usando fenolftaleína como indicador; se comenzó a titular dejando caer el agente titulante (NaOH 0.1 N) sobre el titulado (sobrenadante colectado) gentilmente hasta obtener un ligero vire a rosa; se midió el volumen de agente titulante gastado para determinar la concentración (Ecuación 2). Lo anterior se realizó por triplicado para cada muestreo durante las fermentaciones.

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

Donde  $V_{NaOH}$  es el gasto del agente titulante (mL),  $N$  es la normalidad del agente titulante,  $P_{eq}$  son los equivalentes gramo de la masa molar del ácido láctico ( $CH_3-CHOH-COOH$ ) y  $V_{muestra}$  es la alícuota de muestra titulada (mL).

### **7.9. Análisis estadístico**

Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza del 95%. Al registrarse diferencias significativas entre los resultados se aplicó la prueba de comparación múltiple de Tukey.



## 8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

### 8.1. Fermentaciones a nivel matraz

#### 8.1.1. Crecimiento de la BAL1

En principio, durante el desarrollo paralelo de las investigaciones del grupo de trabajo, por estudios de biología molecular relativos al gen 16S rDNA de la BAL1, así como por su morfología y otras características, ahora se sabe con certeza que esta BAL pertenece al género *Streptococcus* (Mendoza-Mendoza et al., 2013); no obstante, para fines de este trabajo se seguirá haciendo referencia a este microorganismo como BAL1.

Las fermentaciones a nivel matraz (24 h) se realizaron con la finalidad de observar y determinar la máxima velocidad específica de crecimiento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), ésta fue obtenida a partir de la pendiente resultante al graficar el logaritmo natural de la concentración de biomasa en función del tiempo. Dependiendo del valor de  $\mu_{\text{máx}}$  se pueden determinar condiciones adecuadas para favorecer el crecimiento bacteriano durante las fermentaciones con los medios suplementados con lactosuero y/o melazas, y así poder llevar a cabo procesos mejor controlados.

Al realizar las fermentaciones a nivel de matraz con los medios de cultivo alternativos propuestos, en principio se observó que éstos soportan el crecimiento de la BAL1 aislada de pozol. En el Cuadro 4 se puede observar que en el medio MCA-I (medio enriquecido con MRS y lactosuero) BAL1, presentó una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.40 \pm 7.03 \text{E-}02 \text{ h}^{-1}$ ; mientras que el medio MCA-II (medio enriquecido sólo con lactosuero) presentó una velocidad máxima específica de crecimiento de  $0.39 \pm 1.56 \text{E-}02 \text{ h}^{-1}$ , y en el medio MCA-III (medio enriquecido con melazas) BAL1 presentó una  $\mu_{\text{máx}}$  de  $0.38 \pm 1.85 \text{E-}02 \text{ h}^{-1}$ ; ninguno de los medios muestra diferencias estadísticamente significativas en la máxima velocidad de crecimiento, lo cual indica que los medios complejos propuestos son capaces de soportar el

crecimiento bacteriano sin afectar la producción de biomasa. En la producción de sustancias antimicrobianas es importante la estimación de la máxima velocidad de crecimiento en los cultivos microbianos, ya que, como algunos autores sugieren en la literatura, la producción de estas sustancias antimicrobianas está ligada al crecimiento celular debido a que son consideradas como metabolitos primarios (Gobbetti et al., 2005; Arauz et al., 2011; Stoyanova et al., 2012)

**Cuadro 4:** Máxima velocidad específica de crecimiento de la BAL1 en matraz agitado orbitalmente (150 rpm, 30°C). Uso de distintos medios complejos.

Medio de Cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ Media±D.E. (h <sup>-1</sup> )	Tiempo después de iniciada la fermentación (h)	$\Delta R$ Media±D.E. (mm)
MRS	0.33±1.58E-02 $\alpha$	12	6.80± 1.98E-01 $\alpha$
MCA-I	0.40±7.03E-02 $\alpha$	12	5.13± 1.17E-01 $b$
MCA-II	0.39±1.56E-02 $\alpha$	12	4.79± 2.60E-01 $c$
MCA-III	0.38±1.85E-02 $\alpha$	12	4.45±3.78E-01 $d$

$\mu_{\text{máx}}$ = Máxima velocidad específica de crecimiento;  $\Delta R$ = Incremento en el radio de inhibición; D.E.=Desviación estándar. Letras a,b,c,d indican diferencias significativas entre tratamientos (P<0.05).

En la literatura existen diversos reportes acerca de máxima velocidad específica de crecimiento para *Streptococcus* spp. Por ejemplo, Jans y colaboradores (Jans et al., 2012) realizaron estudios metabólicos con diferentes cepas de *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* agitando a 140 rpm, usando medios de cultivo enriquecidos con lactosa, revelando que la  $\mu_{\text{máx}}$  promedio para esta BAL es 1.358 h<sup>-1</sup>. Las condiciones de fermentación empleadas por Jans y colaboradores fueron diferentes a las usadas en este trabajo: utilizaron el método de densidad óptica para medir el crecimiento tomando muestras cada 30 min hasta las 12 h. el crecimiento de los microorganismos se ve fuertemente influenciado por factores como composición de medios de cultivo y condiciones de

operación (Black y Black, 2012). Por tanto no es de sorprender que se encuentren reportes de  $\mu_{\text{máx}}$  para miembros del género *Streptococcus*, por ejemplo, para *S. thermophilus* 404 en el intervalo de 0.48 a 1.74 h<sup>-1</sup> (Beal et al., 1989), o en el caso de *S. cremoris* Wg2 de 0.16 a 0.84 h<sup>-1</sup> (Poolman y Konings, 1988), por citar algunos resultados adicionales de investigadores que han trabajado con este género de BAL.

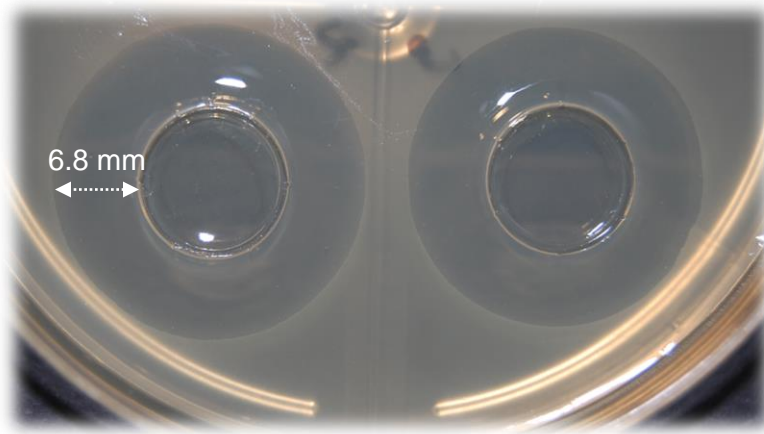
En el Cuadro 4, se puede ver que en el medio MCA-II (enriquecido con lactosuero) la BAL1 presentó una  $\mu_{\text{máx}}$  0.39±1.56E-02 h<sup>-1</sup>, lo cual sugiere que este medio suplementado con lactosuero es favorable para el crecimiento celular de dicha cepa. Otros autores (González-Toledo et al., 2010) han reportado resultados interesantes ( $\mu_{\text{máx}}$ =0.62 h<sup>-1</sup>) propagando la BAL, *Lactococcus lactis* UQ2, con el propósito de producir bacteriocinas a nivel de biorreactor de laboratorio. González-Toledo y colaboradores desarrollaron un diseño experimental capaz de estimar las condiciones óptimas de crecimiento de *L. lactis* UQ2 en caldos enriquecidos con suero dulce de leche.

Por otra parte, en el medio MCA III (enriquecido con melazas) la BAL1 exhibió una  $\mu_{\text{máx}}$  importante comparada con la correspondiente usando MRS, lo cual es concordante con la literatura en el sentido que las melazas incrementan tanto la producción de biomasa como la producción de sus metabolitos, donde se han reportado incrementos en el rendimiento de hasta 4.3 veces, e incluso, al adicionar extracto de levadura, los rendimientos pueden incrementarse hasta 15 veces (Wee et al., 2004; Dumbrepatil et al., 2007).

### **8.1.2. Evaluación del efecto antimicrobiano del sobrenadante producido por la BAL1**

De acuerdo a la metodología establecida por el grupo de trabajo (Mendoza-Mendoza, 2012) descrita en la sección 7.4.1., se obtuvo el sobrenadante concentrado con actividad antimicrobiana producida por la BAL1. Posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes concentrados (véase la

sección 7.6) mediante la prueba de pozos utilizando a *L. monocytogenes* como microorganismo indicador. Se consideró como actividad inhibitoria positiva cuando resultó un halo traslúcido en la prueba de inhibición. En cada ensayo se observó inhibición de *L. monocytogenes* con mayor radio para el caso de los concentrados de 12 h de fermentación; además, estadísticamente existieron diferencias significativas entre los cuatro concentrados evaluados.



**Figura 6.** Aspecto de cultivo sólido de *L. monocytogenes* durante evaluación de actividad antimicrobiana producida por la BAL1 a nivel de matraz con agitación orbital de 150 rpm y 30°C, a las 12 h de fermentación, mediante prueba de pozos.

El concentrado de MRS exhibió un halo de  $6.80 \pm 1.98E-01$  mm, mientras que el de MCA-I (MRS y lactosuero) fue  $5.13 \pm 1.17E-01$  mm, con lo cual se puede ver que el medio con lactosuero si permite que la BAL1 produzca sustancias con actividad inhibitoria contra *L. monocytogenes*. Por otra parte, el concentrado de MCA-II (medio sin MRS) reveló halos traslúcidos de  $4.79 \pm 2.60E-01$ mm, lo cual sugiere que estos medios no sólo soportan el crecimiento de la BAL, sino que también permiten e incluso favorecen la producción de sustancias con actividad antimicrobiana contra la bacteria indicadora estudiada. Los halos de inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* presentados por el medio MCA-III exhibieron un incremento de radio de  $4.45 \pm 3.78E-01$ mm, lo que permite sugerir que el medio alternativo enriquecido con melazas permite que la BAL1 desarrolle también actividad antimicrobiana en estas condiciones. En este último caso, el color café

de la melaza (caramelo) se aprecia también en los halos de inhibición exhibidos usando este caldo concentrado. Los dos medios enriquecidos con lactosuero, tanto MCA-I como MCA-II, revelaron valores  $\Delta R$  importantes en los ensayos de inhibición de listeria. Por tanto, para la continuación de este trabajo se eligió el medio MCA-II para la producción de la BAL1 a nivel biorreactor, en tanque agitado mecánicamente.

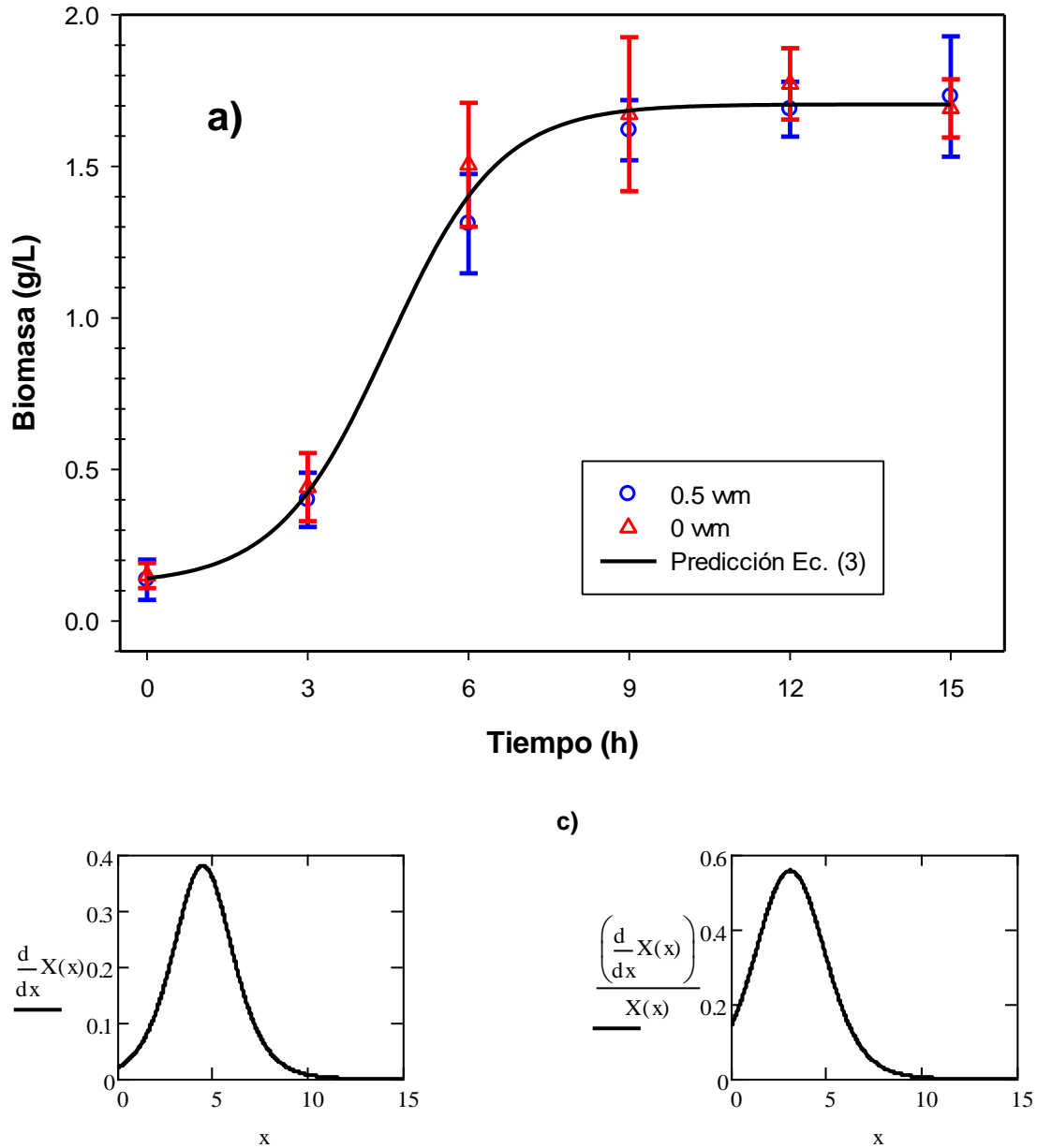
## 8.2. Fermentaciones de la BAL1 a nivel biorreactor

### 8.2.1. Crecimiento celular

La Figura 7a muestra las cinéticas de crecimiento de BAL1 obtenidas en las condiciones de aireación estudiadas (0 vvm y 0.5 vvm), exhibiendo prácticamente el mismo comportamiento en ambas condiciones. La concentración inicial de BAL1 fue de  $0.15 \pm 4.15E-02$  g/L y  $0.14 \pm 6.63E-02$  g/L, en las condiciones 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente. No obstante, en ambos sistemas se alcanzó la máxima concentración de biomasa a las 9 h, siendo prácticamente la misma en ambos casos ( $X_{\text{promedio}}=1.65$  g/L; Desviación estándar,  $DE=0.19$ ), misma que ya no sufrió cambios significativos durante el resto del proceso ( $P<0.05$ ). Con base en estos hechos, todos los datos de concentración de biomasa obtenidos en ambas condiciones de fermentación, fueron ajustados al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, mediante el programa SigmaPlot v. 12.5, obteniéndose un coeficiente  $R^2=0.95$  asociado con la siguiente ecuación,

$$X=0.1203+\frac{1.5844}{\left(1+e^{-\frac{t-4.4975}{1.0407}}\right)} \quad (3)$$

Por otra parte, con base a la Ec. (3), mediante el programa MathCAD v. 14, se determinaron las evoluciones de la velocidad de crecimiento ( $\frac{dX}{dt}$ ; g/(L h)) y de la velocidad específica de crecimiento ( $\mu = \frac{dX}{dt} \cdot \frac{1}{X}$ ; h<sup>-1</sup>), exhibidas en las Figuras 7b y 7c, respectivamente. La  $\mu_{\text{máx}}$  fue  $0.56$  h<sup>-1</sup> independiente de las condiciones de aireación.



**Figura 7.** Cinética de crecimiento de la BAL1 en medio de cultivo MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. a) Evolución de la concentración de biomasa mostrando el mejor ajuste de todos los datos al modelo Sigmoideal 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<sup>-1</sup>).

Como se ha comentado con anterioridad, la bibliografía sugiere que la producción de sustancias antimicrobianas se encuentra estrechamente relacionada con el crecimiento de biomasa de BAL, ya que estas sustancias suelen ser consideradas metabolitos primarios. La Figura 8 presenta el aspecto microscópico característico de la BAL1 cultivada en esta investigación, donde claramente se observa que la bacteria estudiada presentó características del género *Streptococcus*, lo cual se ha confirmado con estudios recientes del gen 16S rDNA, como ya se ha mencionado anteriormente (Mendoza-Mendoza et al., 2013).

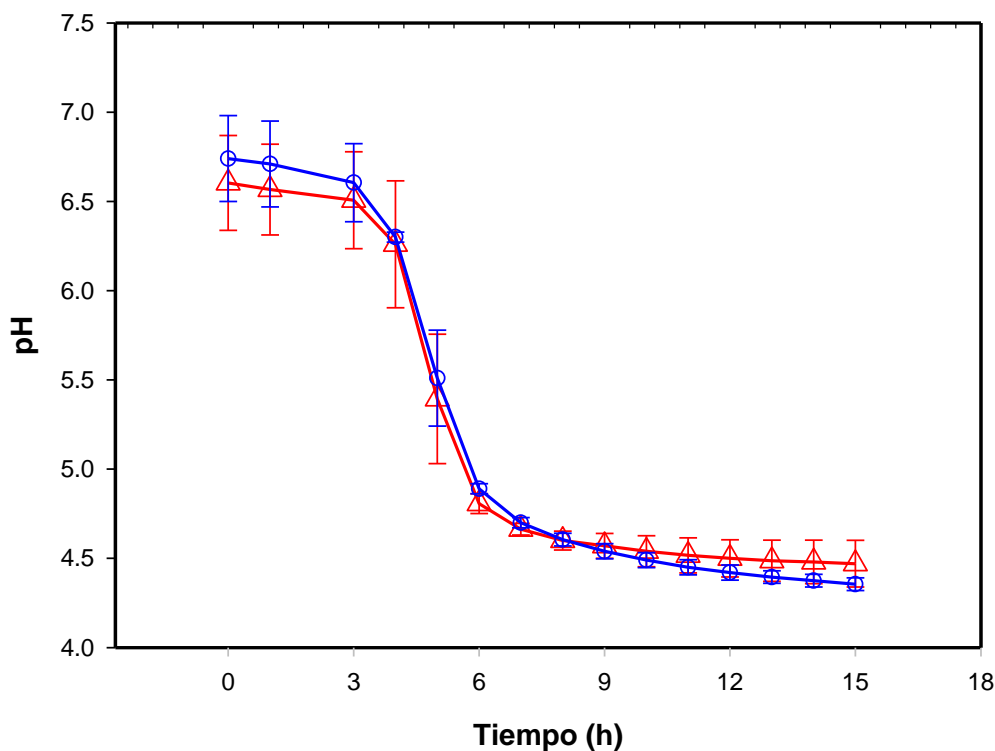


**Figura 8.** Aspecto cualitativo del crecimiento de BAL1 en medio MCA-II en biorreactor,  $t=12$  h (microscopio óptico, 400X)

Arauz y colaboradores (Arauz et al., 2011) estudiaron el crecimiento de *Lactococcus lactis* en medio de cultivo enriquecido con leche descremada en biorreactor, evaluando el comportamiento de la cepa bajo diferentes condiciones de aireación (0 y 1  $L_{aire}/min$ ) y agitación (100 hasta 200 rpm); reportaron un valor  $\mu_{m\acute{a}x}=0.12 h^{-1}$  en procesos con agitación a 200 rpm y sin aireación, mientras que a la misma velocidad de agitación y suministrando 1  $L_{aire}/min$ , la  $\mu_{m\acute{a}x}$  obtenida fue de  $0.17 h^{-1}$ . Por otra parte, González-Toledo y colaboradores (González-Toledo et al., 2010), investigando el uso de lactosuero para la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2, reportaron un valor  $\mu_{m\acute{a}x}=0.62 h^{-1}$ , observando que la concentración de biomasa después de las 6 h fue 2.32 g/L.

### 8.2.2. Comportamiento del pH

Se usó medio MCA-II para crecer la BAL1 y producir agentes antimicrobianos a nivel biorreactor con agitación mecánica utilizando dos turbinas Rushton a 200 rpm con aireación de 1  $L_{aire}/min$  (0.5 vvm) y 0  $L_{aire}/min$  (0 vvm). La Figura 9 presenta la evolución del pH durante las fermentaciones, mostrándose que en ambas condiciones de fermentación no se observó diferencia significativa en la evolución de este parámetro ( $p > 0.05$ ). El pH al iniciar la fermentación fue de  $6.5 \pm 0.2$  y éste descendió gradualmente con el transcurso de la fermentación hasta un valor de 4.5 a las 9 h del proceso.



**Figura 9.** Evolución de pH durante fermentación de BAL1 en medio MCA-II. Clave: (- $\Delta$ -) 0 vvm;(- $\circ$ -) 0.5 vvm.

Iverson y Millis (Iverson y 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

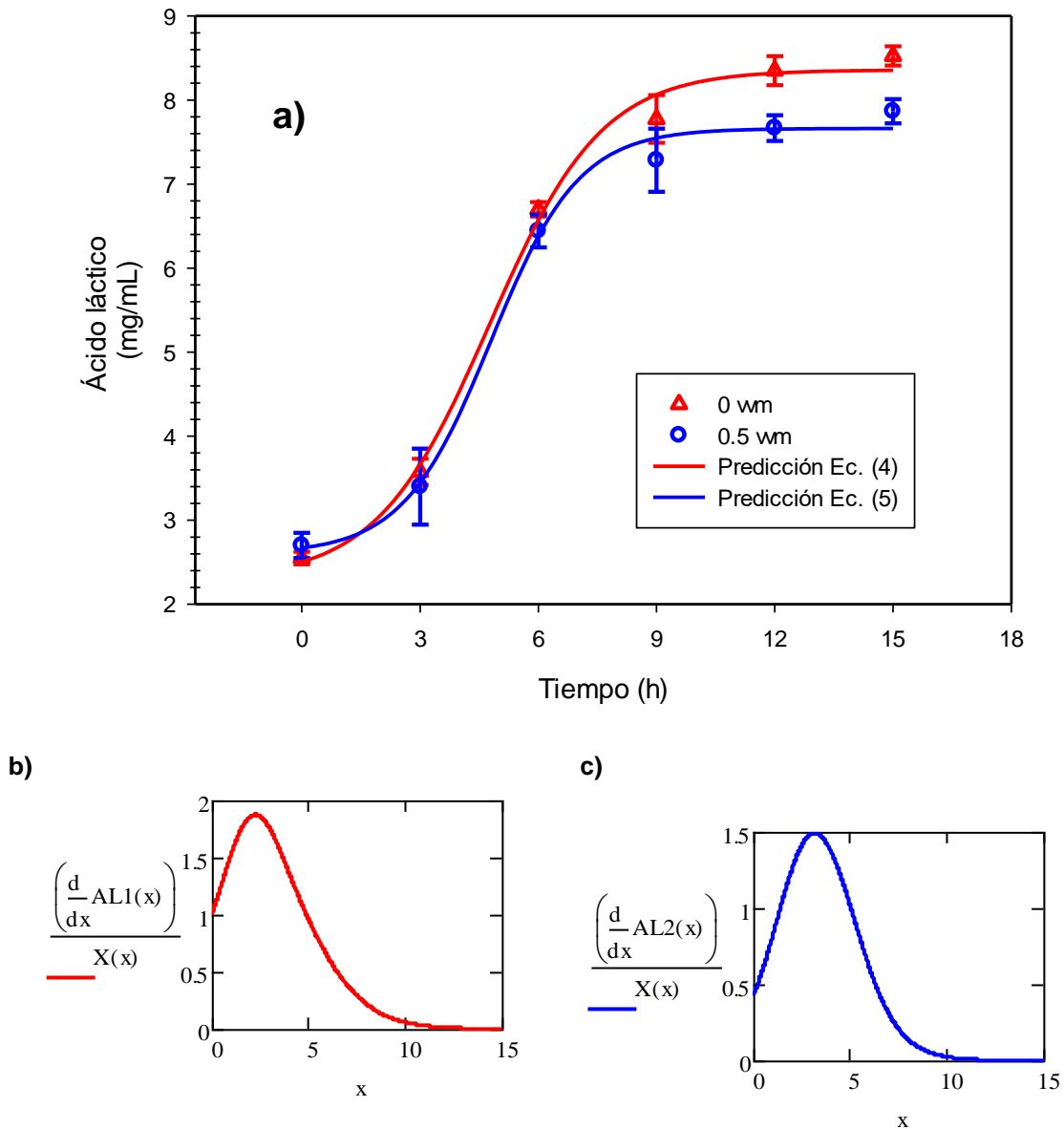


4.2 y 4.4 cuando crecieron sus especímenes en medio compuesto por 0.5 % (p/v) glucosa y 0.05 M buffer TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etano sulfónico). Por otra parte, Jans y colaboradores han reportado que el cultivo de *S. infantarius* subespecie *infantarius* CJ244, aislado en África, 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).

Si se considera que los miembros del género *Streptococcus* son organismos 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 en el pH en el desarrollo de estas fermentaciones – como resultado principal de la acidulación producida por liberación de ácido láctico- como se ha confirmado experimentalmente en cultivos de la BAL1 en el presente trabajo, lo cual es coincidente con lo encontrado por otros autores al realizar estudios con otras especies de BAL del mismo género que la BAL1 aquí utilizada (Iverson y Millis, 1976; Jans et al., 2012).

### 8.2.3. Producción de ácido láctico

La BAL1 pertenece al género *Streptococcus*, las cuales son BAL homolácticas (Prescott et al., 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 presentó en la sección anterior. La cuantificación de ácido láctico en las fermentaciones fue determinada por titulación con solución valorada de NaOH 0.1 N y fenolftaleína como indicador. La Figura 10a presenta la evolución de la producción de ácido láctico en función del tiempo de fermentación, observándose que el comportamiento exhibido por las fermentaciones fue similar, independientemente de la aireación empleada.



**Figura 10.** Cinética de producción de ácido láctico durante fermentaciones de la BAL1 en medio de cultivo MCA-II, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación. a) Evolución de la concentración de ácido láctico mostrando el mejor ajuste de los datos de cada condición de fermentación/aireación al modelo Sigmoideal de 4 parámetros, Ecuaciones 4 y 5, correspondientes a 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente. Velocidades específicas de producción de ácido láctico ( $g_{\text{ácido láctico}}/(g_{\text{biomasa}} h)$ ) asociadas con las condiciones b) 0 vvm y c) 0.5 vvm.

Al inicio de las fermentaciones las concentraciones de ácido láctico fueron  $2.65 \pm 1.89E-01$  g/L y  $2.63 \pm 1.06E-01$  g/L en condiciones de 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente. Tres horas después, las concentraciones eran  $3.58 \pm 1.09E-01$  g/L (sin alimentar aire) y  $3.08 \pm 5.30E-01$  g/L (con alimentación de aire), incrementándose de manera notable hasta  $t=9$  h, con títulos de  $7.75 \pm 3.12E-01$  g/L, en sistema no aireado, mientras que el sistema aireado presentó  $7.48 \pm 2.47E-01$  g/L (al final de proceso se obtuvieron títulos de concentración de ácido láctico sin cambios estadísticamente significativos a partir de  $t=12$  h). Los datos de concentración de ácido láctico obtenidos en cada condición de fermentación, fueron ajustados al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, mediante el programa SigmaPlot v. 12.5, obteniéndose las Ecuaciones 4 y 5, asociadas con valores del coeficiente  $R^2$  iguales a 0.99 y 0.98, respectivamente, y que corresponden a las condiciones de aireación 0 vvm y 0.5 vvm:

$$AL1 = 2.2957 + \frac{6.0622}{\left(1 + e^{-\frac{t-4.7574}{1.4261}}\right)} \quad (4)$$

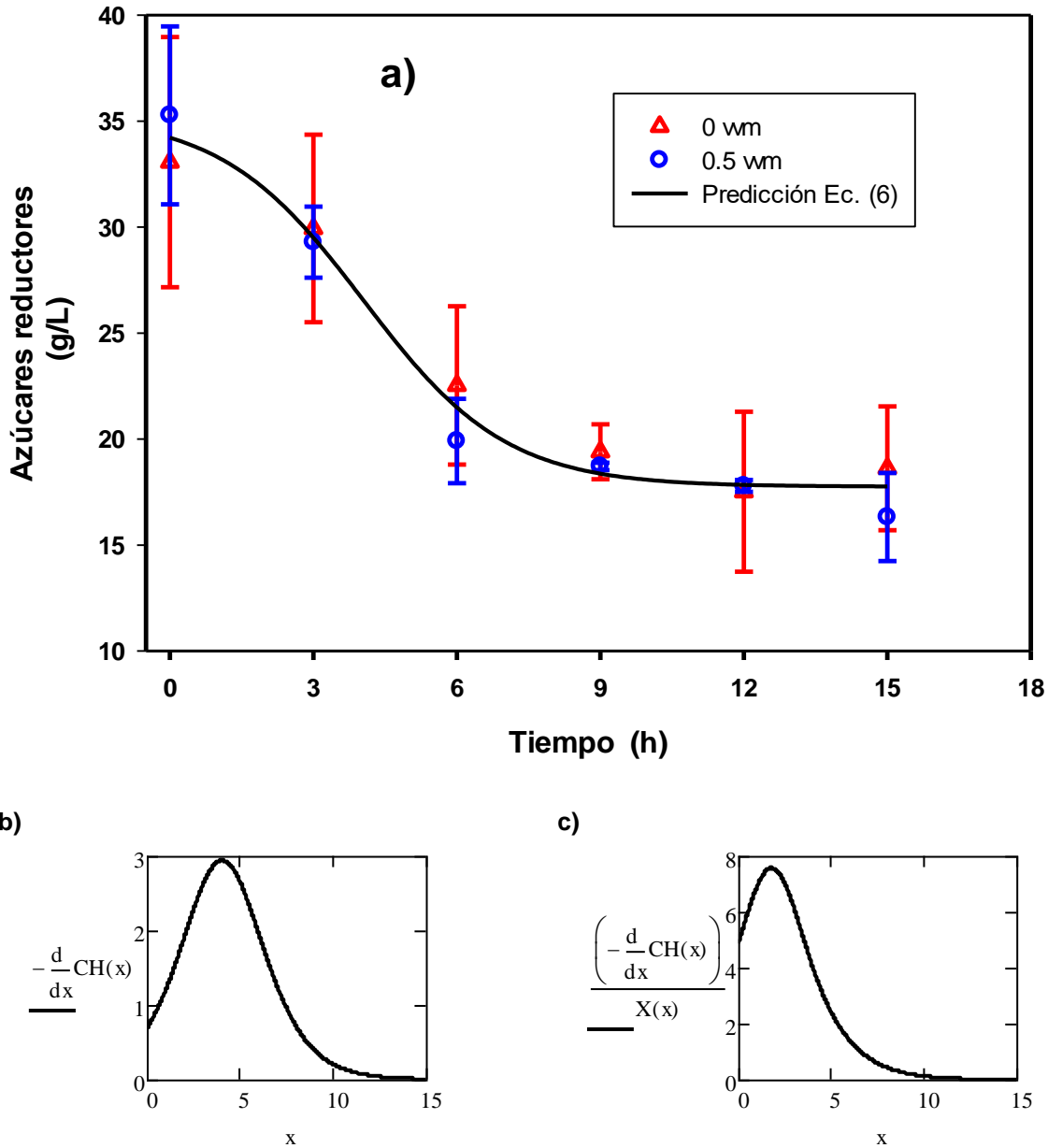
$$AL2 = 2.6027 + \frac{5.059}{\left(1 + e^{-\frac{t-4.7949}{1.1162}}\right)} \quad (5)$$

Como puede observarse en la Figura 10a, existe una evidente reducción en la concentración máxima de ácido láctico alcanzada en las fermentaciones con inyección de aire, lo cual es interesante y pudiese tener relación con el hecho de que en algunas bacterias, como *S. pneumoniae* y algunas BALs, como en el caso de *Lactobacillus plantarum*, cuando el proceso de fermentación se lleva a cabo en presencia de oxígeno, se reduce la conversión de piruvato a lactato, debido a que la enzima piruvato-oxidasa puede catalizar la conversión de piruvato, fosfato inorgánico y oxígeno molecular para dar lugar a peróxido de hidrógeno, bióxido de carbono y fosfato de acetilo, el cual actúa como un grupo donador de fosforilo de alta energía (Ramos-Montañez et al., 2008; Tittmann et al., 2000). Este proceso puede explicar la reducción en las cantidades producidas de ácido láctico, no

obstante, solo puede proponerse como una posibilidad ya que no existen aún estudios en este sentido relativos a la BAL1. Por otra parte, con base en las Ecuaciones (4) y (5), mediante el programa MathCAD v. 14, se determinaron las evoluciones de velocidades específicas de producción de ácido láctico ( $R_{AL} = \frac{d(AL)}{dt} \cdot \frac{1}{X}$ ;  $\text{mg}_{\text{ácido láctico}}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ h})$ ), exhibidas en las Figuras 10b y 10c, correspondientes a las condiciones de aireación 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente. Específicamente, los valores máximos de  $R_{AL}$  fueron  $R_{AL-0\text{vvm}}=1.88$  y  $R_{AL-0.5\text{vvm}}=1.49$   $\text{mg}_{\text{ácido láctico}}/(\text{g}_{\text{biomasa}} \text{ h})$ , siendo mayor en la condición 0 vvm, donde también fue mayor la concentración final de ácido láctico alcanzada (i.e., 8.53  $\text{mg}_{\text{ácido láctico}}/\text{L}$ ,  $DE=0.11$ , y 7.87  $\text{mg}_{\text{ácido láctico}}/\text{L}$ ,  $DE=0.14$ ), para las condiciones 0 vvm y 0.5 vvm, respectivamente). Esta situación puede tener relación con la posible respuesta fisiológica de la BAL1 al crecer en presencia de oxígeno molecular, como ya se ha mencionado en la primera parte de esta sección.

#### **8.2.4. Evolución de la concentración de fuente de carbono en fermentaciones de la BAL1**

En este estudio se usó el método colorimétrico del DNS para determinar la concentración de azúcares reductores en los caldos de fermentación de BAL1. La Figura 11a presenta la evolución exhibida durante los procesos realizados a condiciones de aireación de 0 vvm y 0.5 vvm, donde es clara la disminución en la concentración de azúcares reductores conforme avanza la fermentación, resaltando que el comportamiento es el mismo independientemente de la aireación involucrada. Las fermentaciones comenzaron con una concentración inicial de azúcares reductores de 34.17 g/L ( $DE=4.89$ ) y su rapidez de consumo fue notable hasta  $t=6$  h, registrando 21.22 g/L ( $DE=3.10$ ) en ese momento, para terminar con 17.47 g/L ( $DE=2.65$ ) a las 15 h del proceso, lo cual implica que se consumieron prácticamente la mitad de los azúcares reductores presentes en un inicio.



**Figura 11.** Cinética de consumo de azúcares por parte de BAL1 creciendo en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. a) Evolución de la concentración de azúcares reductores mostrando el mejor ajuste de todos los datos al modelo Sigmoidal de 4 parámetros (Ec. 6). Con base en la Ecuación 6, predicciones de: b) velocidad de consumo de azúcares ( $g_{\text{azúcares}}/(L\ h)$ ), y c) velocidad específica de consumo de azúcares ( $g_{\text{azúcares}}/(g_{\text{biomasa}}\ h)$ ).

Con base en lo anterior, todos los datos de concentración de azúcares en ambas condiciones de fermentación, fueron ajustados al modelo Sigmoidal de 4 parámetros, obteniéndose un coeficiente  $R^2=0.83$  asociado con la siguiente ecuación,

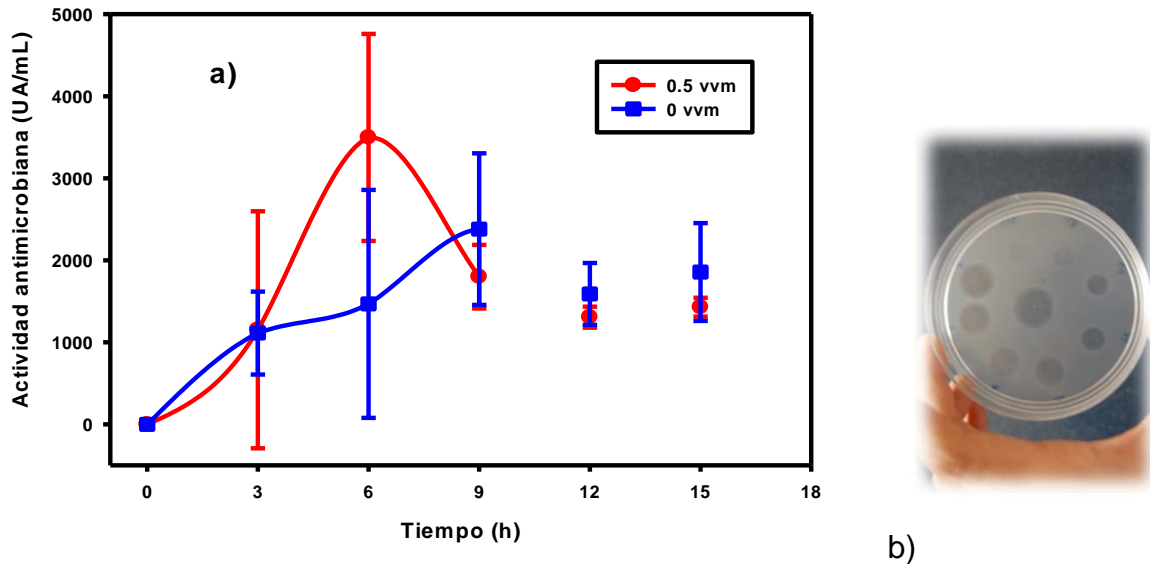
$$CH = 17.7595 + \frac{17.5503}{\left(1 + e^{-\frac{t-4.0489}{-1.4914}}\right)} \quad (6)$$

Con base a la Ec. (6), mediante MathCAD v. 14, se determinaron las evoluciones de la velocidad de consumo de azúcares ( $\frac{dCH}{dt}$ ; g<sub>azúcares</sub>/(L h)) y de la velocidad específica de consumo de azúcares ( $R_{CH} = \frac{d(CH)}{dt} \cdot 1/X$ ; g<sub>azúcares</sub>/(g<sub>biomasa</sub> h)), exhibidas en las Figuras 11b y 11c, respectivamente. La  $R_{CH\text{-máx}}$  fue 7.571 g<sub>azúcares</sub>/(g<sub>biomasa</sub> h) independiente de las condiciones de aireación.

Aunque el comportamiento de la velocidad específica  $R_{CH}$  es importante para caracterizar y controlar procesos de fermentación, lamentablemente no se encuentran valores reportados por otros autores (González-Toledo et al., 2010; Tafreshi et al., 2010; Akkoç et al., 2011), por lo que por el momento no es posible establecer comparativos con otros trabajos con respecto a este parámetro cinético.

### 8.2.5. Actividad antimicrobiana

La producción de sustancias con actividad antimicrobiana por BAL1 se realizó de acuerdo con los métodos establecidos en el grupo de trabajo (Mendoza-Mendoza, 2012) descritos en la sección 7.3.1.; posteriormente se evaluó la actividad antimicrobiana (AaM) por la técnica de difusión en agar (Nuñez, 1996) usando a *Listeria monocytogenes* como indicador. La AaM se expresó como Unidades de Actividad por mL de caldo de fermentación (UA/mL<sub>caldo de fermentación</sub>).



**Figura 12.** Actividad antimicrobiana producida por BAL1 crecida en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. a) Evolución de la actividad antimicrobiana expresada en unidades de actividad por volumen (UA/mL). b) Aspecto de los halos inhibitorios del crecimiento de *Listeria monocytogenes* durante los experimentos para determinar actividad antimicrobiana producida por la BAL1.

La Figura 12a presenta la evolución de la actividad antimicrobiana contra *L. monocytogenes*, dada en (UA/mL), de los caldos de fermentación de BAL1 crecida en medio a base de lactosuero a dos condiciones de aireación, 0 vvm y 0.5 vvm. En principio, se destacan diferencias importantes de actividad entre ambas condiciones de aireación: para la condición 0 vvm, el valor de  $AaM_{m\acute{a}x}$  fue 2380 (UA/mL) (DE=923) y se presentó a las 9 h de proceso, mientras que el valor máximo para la condición 0.5 vvm fue 3498 (UA/mL) (DE=1262) presentándose a  $t=6$  h, es decir, en ambos casos la mayor actividad antimicrobiana fue exhibida dentro de la fase exponencial de crecimiento de la BAL1. Por otra parte, el Cuadro 5 presenta las actividades antimicrobianas específicas (UA/mg<sub>biomasa</sub>) determinadas en la presente investigación.

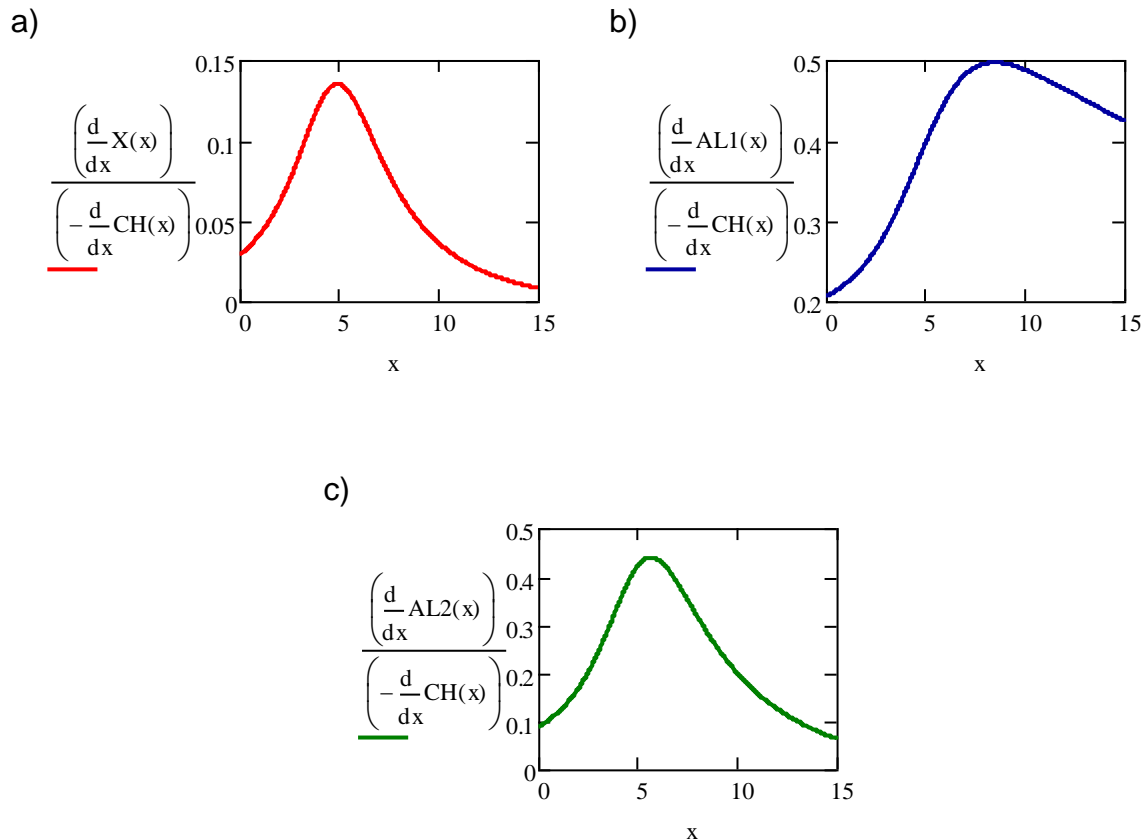
**Cuadro 5.** Actividad antimicrobiana (AaM) específica (UA/mg<sub>biomasa</sub>) producida por la BAL1 crecida en medio MCA-II, en fermentaciones en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación, 0 y 0.5 vvm. Se usó *Listeria monocytogenes* como indicador.

Tiempo (h)	AaM específica (UA/mg <sub>biomasa</sub> )	
	0 vvm	0.5 vvm
0	0	0
3	2520	2884
6	976	2668
9	1424	1112
12	897	774
15	1098	826

Como se puede observar en el Cuadro 5, las mayores actividades antimicrobianas específicas se registraron en el intervalo de 3 a 6 horas de fermentación, siendo notablemente mayores las exhibidas en la condición 0.5 vvm (de hecho, el máximo valor registrado fue 2884 UA/mg<sub>biomasa</sub> y se presentó a t=3 h). Estos resultados son interesantes, ya que aunque no se determinó el rendimiento de actividad antimicrobiana por unidad de biomasa bacteriana, debido a la imposibilidad de modelar adecuadamente las gráficas de la Figura 12a, si se determinaron los rendimientos de azúcares a biomasa ( $Y_{X/CH}$ ) y a ácido láctico ( $Y_{AL/CH}$ ) (Figura 13). Los rendimientos máximos  $Y_{X/CH}$  y  $Y_{AL/CH}$  ocurrieron dentro de la fase de



crecimiento exponencial, siendo  $Y_{X/CH}=0.135 \text{ gBiomasa/gAzúcares}$ , tanto para 0 vvm como 0.5 vvm; mientras que  $Y_{AL/CH}$  fue mayor ( $0.497 \text{ gÁcido Láctico/gAzúcares}$ ) para 0 vvm, que el correspondiente rendimiento para 0.5 vvm ( $0.44 \text{ gÁcido Láctico/gAzúcares}$ ).



**Figura 13.** Rendimientos asociados con el cultivo de BAL1 en medio MCA-II, en tanque agitado mecánicamente (200 rpm) a dos condiciones de aireación: a) Rendimiento de azúcares a biomasa tanto (el mismo tanto a 0 vvm como 0.5 vvm); b) Rendimiento de azúcares a ácido láctico, caso 0 vvm; y c) Rendimiento de azúcares a ácido láctico, caso 0.5 vvm.

Como ya se presentó anteriormente, las fermentaciones exhibieron cinéticas de crecimiento bacteriano y consumo de azúcares prácticamente iguales en ambas condiciones de aireación (i.e., 0 vvm y 0.5 vvm) (Figuras 7a y 11a); no obstante, se presentaron diferencias importantes en lo referente a producción de ácido láctico (Figura 10a) donde fue mayor la concentración alcanzada para 0 vvm (lo cual también se vio reflejado en una mayor acidez para este sistema; Figura 9), así como en la actividad antilisterial determinada, la cual fue mayor para la

condición 0.5 vvm, de acuerdo con lo presentado en esta sección (Figura 12a). Lo anterior sugiere, como mera posibilidad, que en condiciones de mayor aireación (y por lo tanto de mayor oxigenación) la BAL1 pudiese estar modificando su metabolismo para producir menor cantidad de ácido láctico, lo cual parece estar en concordancia con lo reportado por otros autores en distintas BAL (Ramos-Montañez et al., 2008; Tittmann et al., 2000) y que de manera simultánea, bajo esta condición de mayor oxigenación, la BAL1 tuviera la capacidad de producir una mayor actividad antilisterial, lo cual por supuesto requiere de la realización de mayores estudios metabólicos en este sistema biológico.

Otros autores han reportado efectos positivos de la aireación en cultivos por lote de distintas BAL para producir bacteriocinas. González-Toledo y colaboradores, estudiando la producción de nisina por *Lactococcus lactis* UQ2 en medios con lactosuero, encontraron un máximo de 67.7 UI/mL en procesos con aireación de 248 mL/min; en contraste, sin aireación, sólo lograron concentraciones de 19 a 33 UI/mL (González-Toledo et al., 2010). Por otra parte, existen otros grupos que han observado que la producción de bacteriocinas es mayormente favorecida en ausencia de oxigenación, tal como lo reportaron Arauz y colaboradores, quienes realizaron cultivos por lote de *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 en medios con leche descremada, encontrando concentraciones de nisina de 49.88 mg/L en procesos sin aireación, mientras que en tratamientos con aireación de 0.5 a 2  $L_{aire}/min$  la concentración de nisina alcanzada fue notablemente menor (i.e., 15.77 a 17.70 mg/L) (Arauz et al., 2011). Por supuesto deben continuar los estudios con cada espécimen ya que son muchos los factores que determinan los resultados observados por distintos grupos de investigación interesados en la producción de bacteriocinas por BAL (entre algunos de los más importantes se pueden mencionar a los medios de cultivo, condiciones de operación y variedades microbianas utilizadas).

## **9. CONCLUSIONES**

Con relación a la producción de actividad antimicrobiana, particularmente antilisterial, producida por la BAL1 (*Streptococcus* sp.) aislada de pozol, a través de esta investigación se encontró lo siguiente:

1. En fermentaciones llevadas a cabo a nivel de matraz con agitación orbital, se demostró que los medios alternativos propuestos a base de lactosuero y/o melazas, soportaron tanto el crecimiento de la BAL1 como la producción de sustancias con actividad antimicrobiana por parte de este espécimen, lo cual sugiere que estos medios de cultivo pudieran ofrecer la posibilidad de sustitución de medios estándares, como el caldo MRS o M17, los cuales son caros e incrementan los costos de producción en estos procesos.
2. Las fermentaciones en biorreactor revelaron que es posible producir actividad antilisteria por parte de la BAL1 en fermentadores de laboratorio, usando una configuración estándar de tanques agitados mecánicamente, creciendo en medios con lactosuero como ingrediente importante y condiciones de operación convencionales, resaltando el hecho de que la inyección de aire tuvo un efecto positivo en el incremento de la actividad antimicrobiana determinada.

---

## **RECOMENDACIONES PARA FUTURAS INVESTIGACIONES**

- ✓ Realizar la purificación y caracterización de las sustancias antimicrobianas producidas por la BAL1.
  
- ✓ Evaluar si existe efecto antimicrobiano contra otras bacterias indicadoras de importancia en la industria alimentaria.
  
- ✓ Optimizar el proceso de fermentación para producir actividad antimicrobiana por la BAL1.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akkoç, N., Ghamat, A., and Akçelik, M. (2011). Optimisation of bacteriocin production of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MA23, a strain isolated from Boza. *International Journal of Dairy Technology* **64**, 425-432.
- Alquicira-Paez, L. (2006). Determinación del mecanismo de resistencia a la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por *Pediococcus parvulus* MXVK 133. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana, México, D.F.
- Amiali, M. N., Lacroix, C., and Simard, R. E. (1998). High nisin Z production by *Lactococcus lactis* UL719 in whey permeate with aeration. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **14**, 887-894.
- Ananou, S., Muñoz, A., Martínez-Bueno, M., González-Tello, P., Gálvez, A., Maqueda, M., and Valdivia, E. (2010). Evaluation of an enterocin AS-48 enriched bioactive powder obtained by spray drying. *Food Microbiology* **27**, 58-63.
- Arauz, L. J., Jozala, A. F., Baruque-Ramos, J., Mazzola, P. G., Pessoa, A., and Penna, T. C. V. (2011). Culture medium of diluted skimmed milk for the production of nisin in batch cultivations. *Annals of Microbiology* **62**, 419-426.
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. d. M., Converti, A., and Oliveira, R. P. d. S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control* **32**, 134-142.
- Beal, C., Louvet, P., and Corrieu, G. (1989). Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 and *Lactobacillus bulgaricus* 398. *Applied Microbiology and Biotechnology* **32**, 148-154.
- Bhunja, A., Johnson, M. C., and Ray, B. (1987). Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Industrial Microbiology* **2**, 319-322.
- Black, J. G., and Black, L. J. (2012). "Microbiology. Principles and explorations," 8th/Ed. John Wiley & Sons, Inc.
- Burke, D. G., Cotter, P. D., and Ross, R. P. (2013). Microbial production of bacteriocins for use in foods.
- Callewaert, R., and Vuyst, L. d. (2000). Bacteriocin Production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 Is Improved and Stabilized by Fed-Batch Fermentation. *Applied And Environmental Microbiology* **66**, 606-613.
- Carpentier, B., and Cerf, O. (2011). Review--Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology* **145**, 1-8.
- Carvalho, F., Prazeres, A. R., and Rivas, J. (2013). Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment* **445-446**, 385-96.

- Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S., and Vignolo, G. (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina. *Meat Science* **79**, 483-499.
- Castellano, P., Belfiore, C., and Vignolo, G. (2011). Combination of bioprotective cultures with EDTA to reduce *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground-beef patties. *Food Control* **22**, 1461-1465.
- Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 1-20.
- Cotter, P. D., Ross, R. P., and Hill, C. (2013). Bacteriocins - a viable alternative to antibiotics? *Nature Reviews Microbiology* **11**, 95-105.
- De Man, J. C., Rogosa, M., and Sharpe, M. E. (1960). A MEDIUM FOR THE CULTIVATION OF LACTOBACILLI. *Journal of Applied Microbiology* **23**, 130-135.
- De Vuyst, L., and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Production, purification, and food applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **13**, 194-199.
- Díaz-Ruiz, G., Guyot, J. P., Ruiz-Teran, F., Morlon-Guyot, J., and Wachter, C. (2003). Microbial and Physiological Characterization of Weakly Amyolytic but Fast-Growing Lactic Acid Bacteria: a Functional Role in Supporting Microbial Diversity in Pozol, a Mexican Fermented Maize Beverage. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 4367-4374.
- Díaz-Ruiz, G., Omar, N. B., Abriouel, H., Cañamero, M. M., and Gálvez, A. (2012). Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* by bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* EC52 in a meat sausage model system. *African Journal of Microbiology Research* **6**, 1103-1108.
- Drosinos, E. H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M., and Metaxopoulos, J. (2005). Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131. *Journal of Applied Microbiology* **99**, 1314-1323.
- Dumbrepatil, A., Adsul, M., Chaudhari, S., Khire, J., and 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**, 333-335.
- Ennahar, S., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. (1999). Class IIa bacteriocins from lactic acid bacteria: Antibacterial activity and food preservation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **87**, 705-716.
- Escalante, A. (2004). Characterization of bacterial diversity in Pulque, a traditional Mexican alcoholic fermented beverage, as determined by 16S rDNA analysis. *FEMS Microbiology Letters* **235**, 273-279.
- Escalante, A., Wachter, C., and Farrés, A. (2001). Lactic acid bacterial diversity in the traditional Mexican fermented dough pozol as determined by 16S rDNA sequence analysis. *International Journal of Food Microbiology* **64**, 21-31.
- Evans, J. B., and Niven, C. F. (1951). Nutrition of the heterofermentative lactobacilli that cause greening of cured meat products. *Journal of Bacteriology* **62**, 599-603.

- Gandhi, M., and Chikindas, M. L. (2007). Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* **113**, 1-15.
- Garsa, A. K., Kumariya, R., Kumar, A., Lather, P., Kapila, S., and Sood, S. K. (2014). Industrial cheese whey utilization for enhanced production of purified pediocin PA-1. *LWT - Food Science and Technology* **59**, 656-665.
- Ghalfi, H., Benkerroum, N., Doguiet, D. D., Delvigne, F., and Thonart, P. (2007). Comparison of the performances of different fermentation strategies on cell growth and bacteriocin production by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **87**, 541-549.
- Giraffa, G. (2004). Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 251-60.
- Gobbetti, M., De Angelis, M., Corsetti, A., and Di Cagno, R. (2005). Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. *Trends in Food Science & Technology* **16**, 57-69.
- González-Toledo, S. Y., Domínguez-Domínguez, J., García-Almendárez, B. E., Prado-Barragán, L. A., and Regalado-González, C. (2010). Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis* UQ2 using supplemented whey as alternative culture medium. *Journal of Food Science* **75**, M347-M353.
- Goulhen, F., Meghrou, J., and Lacroix, C. (1999). Production of a nisin Z/pediocin mixture by pH-controlled mixed-strain batch cultures in supplemented whey permeate. *Journal of Applied Microbiology* **86**, 399-406.
- Guerra, N. P., Agrasar, A. T., Macías, C. L., and Pastrana, L. (2005). Modelling the fed-batch production of pediocin using mussel processing wastes. *Process Biochemistry* **40**, 1071-1083.
- Héchar, Y., and Sahl, H.-G. (2002). Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Biochimie* **84**, 545-557.
- Iverson, W. G., and Millis, N. F. (1976). Bacteriocins of *Streptococcus bovis*. *Canadian Journal of Microbiology* **22**, 1040-1047.
- Jans, C., Gerber, A., Bugnard, J., Njage, P. M., Lacroix, C., and Meile, L. (2012). Novel *Streptococcus infantarius* subsp. *infantarius* variants harboring lactose metabolism genes homologous to *Streptococcus thermophilus*. *Food Microbiology* **31**, 33-42.
- Jay, J. M. (2000). "Modern Food Microbiology," 6th/Ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, Maryland, USA.
- Lagaron, J. M. O., M.J. ; López-Rubio, A., ed. (2012). "Antimicrobial polymers." John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.
- Leroy, F., and De Vuyst, L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* **15**, 67-78.
- Lv, W., Cong, W., and Cai, Z. (2005a). Effect of sucrose on nisin production in batch and fed-batch culture by *Lactococcus lactis*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **80**, 511-514.

- Lv, W., Zhang, X., and Cong, W. (2005b). Modelling the production of nisin by *Lactococcus lactis* in fed-batch culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **68**, 322-326.
- Marsh, A. J., Hill, C., Ross, R. P., and Cotter, P. D. (2014). Fermented beverages with health-promoting potential: Past and future perspectives. *Trends in Food Science & Technology* **38**, 113-124.
- Mendoza-Mendoza, B. (2012). Caracterización de películas a base de caseinato de sodio, con la inclusión de sustancias antimicrobianas producidas por bacterias ácido lácticas aisladas de pozol. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Tulancingo, Hgo. México.
- Mendoza-Mendoza, B., Rodríguez-Hernández, A., Vargas-Torres, A., Díaz-Ruiz, G., Montiel, R., Ramos-Aboites, H., Castro-Rosas, J., and 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**, 2917-2925.
- Miller, G. L. (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry* **31**, 426-428.
- Núñez, M., Tomillo, J., Gaya, P., and 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* **51**, 7-10.
- Oddone, G. M., Lan, C. Q., Rawsthorne, H., Mills, D. A., and Block, D. E. (2007). Optimization of fed-batch production of the model recombinant protein GFP in *Lactococcus lactis*. *Biotechnology and Bioengineering* **96**, 1127-1138.
- Panesar, P., Kennedy, J., Gandhi, D., and Bunko, K. (2007). Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry* **105**, 1-14.
- Papagianni, M. (2012). Effects of dissolved oxygen and pH levels on weissellin A production by *Weissella paramesenteroides* DX in fermentation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.
- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P., and Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Purification, Properties and use as Biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **50**, 521-542.
- Parente, E., Brienza, C., Moles, M., and Ricciardi, A. (1995). A comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *Journal of Microbiological Methods* **22**, 95-108.
- Pérez-Guerra, N., Fajardo-Bernárdez, P., Torrado-Agrasar, A., López-Macías, C., and Pastrana-Castro, L. (2005). Fed-batch pediocin production by *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 on whey. *Biotechnology and Applied Biochemistry* **42**, 17.
- Pescuma, M., Hébert, E. M., Mozzi, F., and Font de Valdez, G. (2008). Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: evolution of carbohydrates and protein content. *Food Microbiology* **25**, 442-51.



- Pongtharangkul, T., and Demirci, A. (2006). Effects of fed-batch fermentation and pH profiles on nisin production in suspended-cell and biofilm reactors. *Applied Microbiology and Biotechnology* **73**, 73-79.
- Poolman, B., and Konings, W. N. (1988). Relation of growth of *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris* to amino acid transport. *Journal of Bacteriology* **170**, 700-707.
- Prazeres, A. R., Carvalho, F., and Rivas, J. (2012). Cheese whey management: a review. *Journal of Environmental Management* **110**, 48-68.
- Prescott, L. M., Harley, J. P., and Klein, D. A. (2002). "Microbiology," 5th/Ed. The McGraw-Hill.
- Ramos-Montañez, S., Tsui, H.-C. T., Wayne, K. J., Morris, J. L., Peters, L. E., Zhang, F., Kazmierczak, K. M., Lok-To, S., and Winkler, M. E. (2008). Polymorphism and regulation of the *spxB* (pyruvate oxidase) virulence factor gene by a CBS-HotDog domain protein (SpxR) in serotype 2 *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* **67**, 729-746.
- Ray, B. B. A. (2007). *Fundamental Food Microbiology*. CRC Press, New York, USA.
- Rodríguez, N., Salgado, J. M., Cortés, S., and Domínguez, J. M. (2010). Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures produced under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology* **51**, 226-233.
- Stoyanova, L. G., Ustyugova, E. A., and Netrusov, A. I. (2012). Antibacterial metabolites of lactic acid bacteria: Their diversity and properties. *Applied Biochemistry and Microbiology* **48**, 229-243.
- Tafreshi, S.-y. H., Mirdamadi, S., Norouzian, D., Khatami, S., and Sardari, S. (2010). Optimization of Non-Nutritional Factors for a Cost-Effective Enhancement of Nisin Production Using Orthogonal Array Method. *Probiotics and Antimicrobial Proteins* **2**, 267-273.
- 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, México, D.F.
- Tittmann, K., Golbik, R., Ghisla, S., and Hübner, G. (2000). Mechanism of Elementary Catalytic Steps of Pyruvate Oxidase from *Lactobacillus plantarum*†. *Biochemistry* **39**, 10747-10754.
- Valencia-Denicia, E., and Ramírez-Castillo, M.-L. (2009). La industria de la leche y la contaminación del agua. *Elementos* **73**, 27-31.
- Vandenbergh, P. A. (1993). Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiology Reviews* **12**, 221-238.
- Villani, F., Aponte, M., Blaiotta, G., Mauriello, G., Pepe, O., and Moschetti, G. (2001). Detection and characterization of a bacteriocin, garviecin L1-5, produced by *Lactococcus garvieae* isolated from raw cow's milk. *Journal of Applied Microbiology* **90**, 430-439.

- Wang, Y.-H., and Zhang, X. (2007). Influence of agitation and aeration on growth and antibiotic production by *Xenorhabdus nematophila*. *World J Microbiol Biotechnol* **23**, 221-227.
- Wee, Y.-J., Kim, J.-N., Yun, J.-S., and 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**, 568-573.
- Wescombe, P. A., and Tagg, J. R. (2003). Purification and Characterization of Streptin, a Type A1 Lantibiotic Produced by *Streptococcus pyogenes*. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 2737-2747.
- Wolf-Hall, C. E., Gibbons, W. R., and 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**, 2013-2019.
- Xiao, D., Michael Davidson, P., D'Souza, D. H., Lin, J., and Zhong, Q. (2010). Nisin extraction capacity of aqueous ethanol and methanol from a 2.5% preparation. *Journal of Food Engineering* **100**, 194-200.
- Zannini, E. S., S. Osimani, A. et al. (2005). Effect of process parameters on the production of lactic acid bacteria in batch fermentation. *Annals of Microbiology* **Vol. 55**, 273-278.