



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

**CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UNA PROTEÍNA TIPO BACTERIOCINA
DE UNA CEPA DE *Lactobacillus plantarum***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

ESTEFANIE RODRÍGUEZ GARCÍA

ASESORES

DRA. ARMIDA ZÚÑIGA ESTRADA
M en C. IRAIS SÁNCHEZ ORTEGA

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO 2009

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA DEL CENTRO DE
INVESTIGACIONES QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

DEDICATORIA

**A VANESSA, MI MAS PRECIADO TESORO, LUZ DE MI
VIDA, MI MOTORCITO. GRACIAS POR EXISTIR
PRINCESA TU LE DAS MOTIVO A MI VIDA**

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Por darme la oportunidad y la fuerza para sobrevivir en el mundo sobretodo por la fe que me mueve.

A MIS PADRES (LETICIA Y LORENZO)

Por darme siempre lo mejor de ellos, que es vida, amor, educación y mucho apoyo; porque el sueño de ser profesionalista es de ustedes también.

A MI COMPAÑERO (VICKE)

Gracias amor por ser parte de mi vida, por tu amor, paciencia, comprensión, confianza y porque se que siempre voy a contar con tu apoyo.

A MI FAMILIA

Por saber que cuento con ustedes: mis hermanos Yessi, Cris y Bris; quienes más soportaron mis desvelos y traumas. Mi abuela adorada Mami Marí quien no se cansa de aconsejarme. Mis queridos tíos Claudia y Carlos porque siempre he podido contar con su apoyo y cariño al igual que mi compadre Chucho. A mi suegro Enrique y Mari por el gran apoyo y paciencia. Gracias por siempre estar al pendiente de mi vida.

A MIS ASESORAS

Doctora Armida, le agradezco su paciencia y el gran apoyo que me ofreció para realizar el trabajo, al igual que la Maestra Irais.

A MIS PROFESORES

Por compartirme sus conocimientos y haberme dedicado su tiempo. Pero un especial agradecimiento al Doctor Filardo por ser un gran amigo.

ÍNDICE GENERAL

I. INTRODUCCIÓN	
II. ANTECEDENTES	
2.1. Bacterias Ácido Lácticas (BAL)	4
2.1.1. Importancia de las (BAL)	4
2.1.2. Definición y características generales	5
2.1.3. Clasificación y géneros representativos	6
2.1.4. Métodos de identificación de las (BAL)	11
2.1.5. Compuestos antimicrobianos producidos por las (BAL)	12
2.2. Bacteriocinas	16
2.2.1. Clasificación	16
2.2.2. Mecanismo de acción	18
2.2.3. Producción y caracterización	23
2.2.4. Métodos de purificación	25
2.2.5. Importancia de las bacteriocinas en la industria alimentaría	26
2.2.6. Elementos de efectividad	27
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. OBJETIVOS	32
V. MATERIALES Y METODOLOGÍA	33
5.1. Materiales y equipos	33
5.1.1. Material de vidrio y desechable	
5.1.2. Equipos	33
5.1.3. Medios de cultivo	33
5.1.4. Reactivos	33
5.2. Metodología	35
5.2.1. Origen de la cepa BAL	
5.2.2. Purificación parcial de la Proteína tipo Bacteriocina	35
5.2.2.1. Obtención del extracto parcialmente purificado (EPP)	35
5.2.2.2. Electroforesis en gel (PAGE-SDS) DEL (EPP)	36
5.2.3. Separación de la Bacteriocina por adsorción-desorción	38
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
VII. CONCLUSIONES	48
VIII. ANEXOS	49
IX. BIBLIOGRAFÍA	51

ÍNDICE DE TABLAS

1. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud	5
2. Algunos géneros de BAL utilizables como cultivos lácticos.	7
3. Compuestos inhibitorios producidos por (BAL) y su mecanismo de acción	13
4. Bacteriocinas y microorganismos productores	17
5. Bacteriocinas producidas por (BAL) y microorganismos sensibles	19
6. Condiciones del gel de electroforesis	37
7. Purificación de la proteína tipo bacteriocina producida por la cepa <i>Lb. plantarum</i>	42

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana	20
2. Sensibilidad de <i>Salmonella</i> Typhimirium a la proteína tipo bacteriocina producida por la cepa 110 <i>Lb. plantarum</i> en medio MRS sin glucosa	44
3. Electroforesis en gel PAGE-SDS	45
4. Detección de actividad inhibitoria en gel	46

I. INTRODUCCIÓN

Durante cientos de años los microorganismos han desempeñado un papel importante en la obtención y producción de la mayor parte de los alimentos fermentados que actualmente se consumen, entre los que se incluyen el yogur, quesos, embutidos crudos curados, encurtidos y otros. En este contexto las bacterias lácticas desempeñan un papel fundamental en la tecnología de los alimentos fermentados. No obstante, antes de esta exitosa inversión industrial y comercial, fue necesario aislar, caracterizar y seleccionar las bacterias lácticas de mayor interés en la obtención de alimentos fermentados. Ello ha conducido también al conocimiento del metabolismo y de otras características fisiológicas, bioquímicas, inmunológicas y genéticas de dichas bacterias; sin estos conocimientos el avance experimentado por la industria láctea, seguramente no sería el mismo (Deegan, 2006).

Las bacterias lácticas son un grupo de microorganismos Gram positivos de forma bacilar o cocoide, que tienen la característica de producir ácido láctico y otros compuestos como acetato, etanol, CO₂, formato y succinato a partir de carbohidratos fermentables. Este grupo de bacterias incluye géneros como *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Pediococcus*, que pueden ser aisladas a partir de alimentos fermentados, masas ácidas, bebidas, plantas y los tractos respiratorio, intestinal y vaginal de animales de sangre caliente, entre otros (Savadogo y col., 2006). Estas bacterias son consideradas efectivas en la conservación y control de desordenes gastrointestinales (Schrezenmeir, 2001; Guandalini y col., 2000). El amplio uso de las bacterias ácido lácticas en la conservación de alimentos se debe a que producen ácidos orgánicos y una gran variedad de sustancias antimicrobianas como peróxido de hidrógeno (H₂O₂), dióxido de carbono (CO₂), diacetil y bacteriocinas (Podolak y col., 1996).

Las bacteriocinas son compuestos de naturaleza peptídica, sintetizados ribosomalmente y que, generalmente, tienen como blanco la membrana celular. Las bacteriocinas han recibido una gran atención de la industria alimentaria debido a su aplicación potencial en la conservación de alimentos

como sustitutos de aditivos químicos (Lewus y col., 1991). El aislamiento y caracterización de cepas de BAL productoras de bacteriocinas, cuya capacidad fermentativa sea paralela con la actividad para inhibir microorganismos patógenos y deterioradores potencialmente presentes en el proceso de elaboración de los alimentos, permitirá incrementar el conocimiento acerca del potencial de cepas de BAL autóctonas con propiedades bacteriocinogénicas, para ser utilizadas como cultivos iniciadores, lo que representa tener un mejor control sobre los procesos de fermentación y, al reducir la carga microbiana del producto final por la inhibición producida por las bacteriocinas, se logra un incremento en la vida de anaquel y en la calidad microbiológica del producto terminado y se reducen los riesgos a la salud del consumidor (Hoover y Steenson, 1993). En la actualidad, las únicas bacteriocinas utilizadas comercialmente son la nisina, producida por *Lactococcus lactis* (Nisaplin™; Danisco, Dinamarca), y la pediocina PA-1, producida por *Pediococcus acidilacti* (ALTATM2431; Kerry Bioscience, Carrigaline, Co. Irlanda). Otras bacteriocinas, como las lacticinas 3147 y 481, están a la espera de ser comercializadas (Deegan, 2006). *Lactobacillus plantarum* es una de las bacterias más utilizadas en la producción de alimentos fermentados y hasta el momento se han descrito una gran cantidad de bacteriocinas producidas por diferentes cepas (Pal y col., 2005).

El objetivo de este proyecto consiste en seleccionar una cepa de *Lactobacillus plantarum* productora de una proteína tipo bacteriocina, para su caracterización parcial. Para ello anteriormente se realizó el aislamiento de BAL a partir de productos fermentados lácteos realizado por Clavel (2006); identificada bioquímicamente por Ortiz (2006) y posteriormente se realizó el escrutinio de la cepa productora de proteínas tipo bacteriocinas mediante pruebas de actividad inhibitoria contra microorganismos deterioradores y patógenos en un trabajo de investigación realizado por Neria (2006). La cepa 110 *Lactobacillus plantarum* se seleccionó para llevar a cabo la purificación y caracterización parcial del compuesto. La purificación parcial de la proteína tipo bacteriocina se llevó a cabo mediante precipitación con sulfato de amonio, diálisis y concentración con polietilenglicol; así como la caracterización del

compuesto parcialmente purificado para lo cual se determinó concentración de proteínas, actividad inhibitoria y peso molecular por electroforesis en gel de poliacrilamida.

II. ANTECEDENTES

2. 1. BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Este grupo de bacterias, probablemente sea el más abundante y más difundido en la naturaleza, debido a la capacidad que poseen de crecer en una variedad de sustratos y en diversas condiciones biológicas. Se encuentran en sustratos de origen animal de un pH neutro, así como en los de elevada acidez como son, normalmente, los de origen vegetal. También se encuentran en ambientes de elevadas temperaturas y de altas concentraciones de cloruro sódico. Afortunadamente, estas bacterias producen ácido láctico como producto final de su metabolismo, que este además de no ser tóxico para el hombre y de poseer un sabor agradable, influye en el pH del medio reduciéndolo e impidiendo así el desarrollo de microorganismos perjudiciales (Jay, 2000).

2.1.1 IMPORTANCIA DE LAS BAL

Las bacterias lácticas tienen un papel importante en la conservación y fermentación de alimentos, además de mejorar la calidad higiénica de los mismos por inhibir la flora competitiva y la flora patógena (Cintas y col., 2001). Las bacterias antagonistas han sido reconocidas por siglos pero en años recientes este fenómeno ha recibido más atención por los investigadores, debido a su potencial utilidad como sustancias naturales en la producción de alimentos para preservar la vida y la seguridad. Actualmente los consumidores hacen conciencia de su salud, por lo que la dieta juega un rol muy importante en la prevención de las enfermedades y la promoción a la salud. Por consiguiente, hay un incremento en la tendencia por los alimentos que contienen cultivos probióticos (Zúñiga, 2000). Fuller (1992) definió a los probióticos como "aquellos microorganismos vivos, principalmente bacterias y

levaduras, que son agregados como suplemento en la dieta y que afectan en forma beneficiosa al desarrollo de la flora microbiana en el intestino". Entre los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran las BAL, que incluyen generalmente a las especies *Lactobacillus acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. casei* spp *rhamnosus*, *Lb. delbrueckii* spp *bulgaricus*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. longum*, *B. breve*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, entre otros (Farnworth, 2001). A los probióticos se les atribuyen numerosos efectos benéficos para la salud (Tabla 1) y son muchos los trabajos que demuestran tales beneficios (Morais y col., 2004)

Tabla 1. Principales microorganismos probióticos y algunos de sus efectos benéficos para la salud.

Microorganismo	Efecto benéfico
<i>Lb. acidophilus</i> LC1	Equilibrio de la flora intestinal y efectos en el sistema inmunitario
<i>Lb. acidophilus</i> NCFCO1748	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas, de diarreas y constipación.
<i>Lb. acidophilus</i> NCFM	Reducción de la actividad de enzimas procancerígenas.
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	Inmunoestimulador, diarreas e inflamación del intestino.
<i>Lb. bulgaricus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>Lb. casei</i>	Promotor del crecimiento y de la viabilidad de probióticos.
<i>S. thermophilus</i>	Inmunoestimulador, absorción de lactosa.
<i>B. bifidum</i>	Diarreas por rotavirus, equilibrio de la microbiota.
<i>S. boulardii</i>	Prevención de diarrea y tratamiento de colitis

2. 1. 2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES

En 1919 Orla-Jensen elaboró una monografía en la que apunta que "las verdaderas bacterias del ácido láctico constituyen un grupo natural de bacilos y cocos Gram positivos, inmóviles, no esporulados que al fermentar azúcares forman principalmente ácido láctico", además de que son catalasa y oxidasa

negativas, sin citocromos, anaerobias pero aerotolerantes, acidúricas y estrictamente fermentativas con producción de ácido láctico como principal producto final. Se desarrollan bien en un hábitat rico en nutrientes (cárnicos y lácteos) y mucosas del cuerpo de mamíferos como boca, intestino y vagina (Jay, 2000).

Las BAL se caracterizan por numerosas exigencias nutricionales, ya que pueden crecer en medios ricos en vitaminas, bases nitrogenadas y fuentes de carbono, como la leche, productos lácteos, vegetales en descomposición, carnes, etc. Las vitaminas necesarias están presentes en la leche en concentraciones generalmente suficientes pero la adición a la leche de extracto de levadura rico en vitaminas mejora el crecimiento bacteriano; ciertas vitaminas no son esenciales pero tienen un efecto estimulante sobre el crecimiento (Leveau y Bouix, 2000).

Existen diversas características que nos permiten diferenciar los géneros de las BAL, como la forma de fermentar la glucosa, el crecimiento a diferentes temperaturas, la tolerancia a diferentes concentraciones de cloruro de sodio y el crecimiento a diferentes valores de pH, entre otros (Jay, 2000). Las BAL pertenecen al Phylum *Firmicutes* y están dentro de la clase *Lactobacillales*. Actualmente se cuentan con técnicas que en base a su composición genética nos permite clasificar a las BAL (Leveau y Bouix, 2000). Con base a la secuencia del gen ribosomal 16S (ADNr 16S) se han identificado 6273 genes ADNr 16S de bacterias ácido lácticas las cuales se encuentran distribuidas en seis familias: *Lactobacillaceae*, *Leuconostocaceae* y *Streptococcaceae* con 3 géneros cada una, *Aerococcaceae* y *Enterococcaceae* que comprenden 7 géneros cada una y *Carnobacteriaceae* la cual es la familia más numerosa con 14 géneros (Axelsson, 2004).

2.1.3. CLASIFICACIÓN Y GÉNEROS REPRESENTATIVOS

Al tratarse de un grupo heterogéneo, las BAL están representadas por varios géneros de importancia. Sus células son cocos: *Streptococcus*, pero

también *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y bacilos: *Lactobacillus*. Se distinguen también por su grupo de fermentación: homoláctica o heteroláctica. De acuerdo a lo señalado en la tabla 2 se muestran algunos de los microorganismos que en la actualidad están siendo utilizados como cultivos iniciadores (Villegas, 2004).

Tabla 2. Algunos géneros de BAL utilizables como cultivos lácticos

	MESÓFILOS	TERMÓFILOS
	<i>Lactobacillus</i>	
Homofermentativos	<i>Lb. casei</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. helveticus</i> <i>Lb. bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> <i>Lb. acidophilus</i>
	<i>Streptococcus</i>	
	<i>S. cremoris</i> <i>S. lactis</i> <i>S. diacetylactis</i> <i>Enterococos:</i> <i>E. faecalis.</i> <i>E. faecium</i> <i>E. durans</i>	<i>S. thermophilus</i>
Heterofermentativos	<i>Leuconostoc</i> <i>Leuc.cremoris</i> (<i>citrovorum</i>) <i>Leuc.lactis</i> (<i>paracitrovorum</i> o <i>dextranicum</i>)	
	<i>Lactobacillus</i>	
	<i>Lb. brevis</i> <i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. fermentum</i>

Alrededor de 20 géneros, de los cuales *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Weisella*, *Aerococcus* y *Oenococcus* tienen

mayor incidencia y relevancia en la microbiología de los alimentos y se describen brevemente a continuación (Axelsson, 2004).

Lactobacillus. Bacilos o cocobacilos no esporulados, aerotolerantes o anaerobios, acidúricos o acidófilos, con requerimientos nutricionales complejos. Incluyen especies homofermentativas obligadas, heterofermentativas facultativas y heterofermentativas obligadas, con un contenido de Guanina-Citosina en el ADN de 33-50 mol% (Couret y col., 2003). Alrededor de 124 especies conforman el género (Koort, 2006). Ocasionalmente los *Lactobacillus* forman pigmento amarillo, rosa o rojo ladrillo. Los límites de temperatura para desarrollar van de 2-53°C con óptima de 30-40°C. Se aíslan fácilmente de productos cárnicos, lácteos, de pescados, aguas, frutas, verduras y ensilados. Son frecuentes en la cavidad oral, contenido intestinal y vagina de mamíferos. Las especies homofermentativas están asociadas con el hombre y animales, las especies heterofermentativas están asociadas con los alimentos, en donde llevan a cabo fermentaciones controladas o causan deterioro especialmente bajo refrigeración de productos empacados. Las especies heterofermentativas obligadas son comunes en productos lácteos, cereales, verduras fermentadas y tracto intestinal (Wood y Holzapfel, 1995). En las bacterias de este género es común la producción de bacteriocinas.

Streptococcus. Cocos de 0.8-1.2 μm , dispuestos en cadenas hasta con más de 50 células o en pares. Anaerobios facultativos. Especies comensales del hombre y en mucosas animales (boca, tractos alimenticio, urinario y respiratorio). Con 39 especies, de las cuales tienen interés las especies *Streptococcus pyogenes*, con intensa actividad betahemolítica, como patógeno transmitido por los alimentos a partir de fuentes humanas y *S. agalactiae* de fuentes animales principalmente. La especie *S. thermophilus* es un termófilo, con cepas específicas que se utiliza en la fermentación de productos lácteos, sobre todo en combinación simbiótica con otras BAL. Por ejemplo *Lb. bulgaricus* estimula al estreptococo liberando aminoácidos mientras que este forma compuestos relacionados con el ácido fórmico, que promueven el

desarrollo del lactobacilo, lo cual se conoce como protocooperación, propiedad aprovechada en la elaboración de yogurt (Wood y Holzapfel, 1995). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 34-46 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Pediococcus. Cocos de 1.0-2.0 μm , se dividen alternativamente en dos planos perpendiculares dando lugar a la formación de tétradas, raramente se observan células aisladas, son catalasa negativos, Gram positivos y con un contenido de G-C en el ADN de 34-44 mol%. Anaerobios facultativos. Homofermentativos. Algunas cepas son productoras de bacteriocinas. Empleados como cultivos iniciadores de salchichas semisecas. Son deterioradores de cerveza y sidra. Requieren medios complejos para desarrollarse. No patógenos, pero con actividad descarboxilasa intensa (Wood y Holzapfel, 1995). Consiste aproximadamente de 8 especies, para diferenciar entre cepas dentro del género *Pediococcus* se han usado varias técnicas moleculares (Simpson y col., 2001).

Carnobacterium. Este género se originó del *Lactobacillus* cuando se observaron diferencias significativas en cepas aisladas de carnes empacadas. Son bacilos de 0.5-0.7 x 1.1-3.0 μm . En cultivos viejos se alargan y tienden a perder el Gram, psicrótrofos y de metabolismo predominantemente homofermentativo. Menos rigurosos que otras BAL en sus demandas nutricionales y de intolerancia al oxígeno. Se aíslan de la carne y productos cárnicos, pescado y agua de mar. Producen bacteriocinas. Pueden diferenciarse de *Lactobacillus* por su capacidad de crecimiento a valores de pH de 9, no tienen actividad a valores de pH 4.5, ni en agar acetato a pH de 5.4 y no se multiplican a 45°C (Stiles y Holzapfel, 1997). Se distinguen seis especies en el género: *C. alterfunditum*, *C. funditum*, *C. mobile*, *C. divergens*, *C. gallinarum* y *C. psycicola*, las tres primeras móviles, todas pueden desarrollar a 0 °C; solo la penúltima fermenta la lactosa y la última débilmente. Otras pruebas bioquímicas y la relación de contenido G-C permiten la diferenciación de todas las especies con un contenido en el ADN de 32-36 mol% (Rachman y col., 2004).

Lactococcus. Se puede reconocer como la bacteria láctica por excelencia de la leche. Es la BAL más frecuentemente utilizada como cultivo iniciador en la obtención de productos lácteos cultivados, en particular quesos y leches. Consiste en células ovoides que aparecen aisladas, en pares o en cadenas. Algunas cepas forman material gelatinoso que les rodea a manera de cápsula. Recuperables de leche cruda y algunas plantas. No se aíslan de la materia fecal. Homofermentativos. Se comportan como auxótrofos para diversos aminoácidos y son también dependientes de diversas vitaminas (Stiles y Holzapfel, 1997). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 38-40 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Leuconostoc. Recuperable de vegetales, productos cárnicos y lácteos, ensilados, vinos y productos fermentados. Requieren medios complejos para desarrollar. Algunas especies son acidotolerantes. Temperatura óptima de 20 a 30°C, con un valor de pH final en caldo glucosa de 4.4-5.0. Heterofermentadores obligados. Está muy relacionado con el género *Lactobacillus* cuyas formas cocoides y heterofermentadores pueden confundirse con *Leuconostoc*. Involucrados en el deterioro de alimentos ricos en carbohidratos simples, pero utilizados en forma controlada en la fabricación de algunos quesos debido a la generación de aromas apreciables. Su desarrollo es más lento que otras BAL, las cuales suelen desplazarlo en cultivos mixtos (Wagner y col., 2005). Tienen un contenido de G-C en el ADN de 38-40 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Vagococcus. Está más relacionado con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* además de *Listeria*, que con *Streptococcus* y *Lactococcus*. Los *Streptococcus* aislados de pollo y agua fueron designados como *Vagococcus fluviales*. Una nueva especie de *V. salmoninarum* fue aislada de peces infectados con *Salmonella*. Comprende bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas individualmente, en pares o cadenas, son catalasa negativas, anaerobias facultativas, tienen un contenido G-C en el ADN de 34 mol% (Bascomb y Manafi, 1998).

Tetragenococcus. Especie incluida en el género *Enterococcus*. Para su crecimiento requiere NaCl a una concentración de 18%. Esta más relacionada con los géneros *Enterococcus* y *Carnobacterium* que con *Lactobacillus*, se diferencia del género *Pediococcus* por su incapacidad para crecer en medios con vancomicina; sin embargo comparten diferentes características fisiológicas (Facklam y Elliott, 1995).

Weisella. Es un género nuevo que ha sido creado para incluir a un miembro del género *Leuconostoc* el cual es *Leuc. paramesenteroides*. De igual manera, se incluyen dentro de este género miembros heterofermentativos del género *Lactobacillus* como *Lb. viridescens* y que ahora fue renombrado como *W. viridescens* (Björkroth y col., 2002).

Aerococcus. Consiste en un grupo de bacterias Gram positivas, dispuestas de tétradas y en racimos; aunque también se pueden encontrar individualmente y por pares, son anaerobias facultativas, catalasa negativa. Para su identificación se ha usado la secuenciación del ARNr 16S (Facklam y Elliott, 1995).

Oenococcus. Comparten ciertas características fisiológicas y genéticas con el género *Leuconostoc* del cual fueron separadas debido a que *Oenococcus* desarrolla en condiciones acidófilas, por la tolerancia a concentraciones de etanol de 10% y diferencias de tipo genético. Bacterias Gram positivas, con células ovoides dispuestas en pares o cadenas; heterofermentativas, catalasa negativas, no esporuladas, sin motilidad, aerobias facultativas, con un contenido G-C en el ADN de 38-42 mol% (Stiles y Holzapfel, 1997).

2.1.4. MÉTODOS DE IDENTIFICACIÓN DE LAS BAL

Las BAL pueden detectarse en una diversidad de alimentos tanto crudos (frutas, verduras) como procesados (lácteos, cárnicos), madurados o no. Su

número es variable en los diferentes alimentos. La mayor parte de los estudios sobre BAL han sido realizados sobre todo con bacterias aisladas de leche o de productos lácteos (Leveau y Bouix, 2000).

La identificación más ampliamente utilizada de las cepas a nivel de género y especie, se basa en las siguientes características fisiológicas y bioquímicas:

- Crecimiento a diferentes temperaturas (10-15 y 45°C)
- Tolerancia a diferentes concentraciones de NaCl (2, 4 y 6.5%)
- Producción de NH_3 a partir de arginina
- Fermentación de carbohidratos (arabinosa, celobiosa, fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, manitol, manosa, rafinosa, ramnosa, sacarosa, salicina, sorbitol, trehalosa y xilosa)
- Producción de acetoína
- Hidrólisis de esculina
- Sobrevivencia a tratamiento térmico (63 y 65°C).

Sin embargo, estas técnicas no proporcionan suficiente información, requieren de mucho tiempo para el análisis y además confían en características visuales subjetivas. Para hacer la identificación de aquellas bacterias que se encuentran en poblaciones complejas, han surgido pruebas como los micrométodos que disminuyen costo y tiempo de realización de las mismas (Pereda y col., 1990). Los métodos fenotípicos de tipificación facilitan y aportan mayor precisión a la clasificación taxonómica (Narváez y col., 2005).

2.1.5. COMPUESTOS ANTIMICROBIANOS PRODUCIDOS POR LAS BAL

Debido a su metabolismo, las BAL desempeñan un papel importante en la obtención de alimentos fermentados. Además de conferir características organolépticas diferentes y deseables; actualmente el interés en el estudio de las BAL se debe a su efecto antagonista contra microorganismos patógenos, el cual es atribuido a algunas de sus características bioquímicas (Tabla 3); como

la producción de metabolitos que inhiben el desarrollo de bacterias alterantes y patógenas (Turgay y col., 2002). La utilización de BAL o sus metabolitos como bioconservadores incrementa la obtención de alimentos más seguros con una reducción considerable de las cantidades de aditivos químicos empleados habitualmente y/o la intensidad de los tratamientos aplicados (Gutiérrez, 2005).

Tabla 3. Compuestos inhibitorios producidos por BAL y mecanismo de acción

Componente inhibitorio	Mecanismo de acción
Ácido láctico	Ruptura del metabolismo celular
Peróxido de hidrogeno	Inactivación de biomoléculas esenciales por el anión superóxido de la reacción en cadena, activación del sistema lactoperoxidasa.
Dióxido de carbono	Ambiente anaerobio y/o inhibición de enzima, descarboxilación y/o ruptura de la membrana celular
Diacetilo	Interfiere en la utilización de la arginina
Bacteriocinas	Ruptura de la membrana citoplasmática (nisina)

La mayoría de las BAL pueden convertir los carbohidratos en ácidos orgánicos, ácido láctico o ácido acético. El H_2O_2 que es producido por las BAL en condiciones de microaerofilia, el cual tiene efecto inhibitorio sobre diversos microorganismos así como el diacetilo y el CO_2 , también participan en el efecto antagonista las bacteriocinas de algunas BAL que son consideradas para explicar la actividad antagonista de las BAL (Jay, 2002). Otro punto importante que opera en el proceso es la competencia por los nutrientes disponibles en el medio, con notable participación en el efecto antagónico (Adams y Moss, 1997).

El ácido láctico es el principal metabolito producido por las BAL, es producido naturalmente durante la fermentación de los alimentos, incluyendo los géneros *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, y *Carnobacterium* (Ray y Daeschel, 1992). El bajo pH afecta

varios aspectos del metabolismo celular, que retarda el crecimiento de microorganismos no deseados en el medio de cultivo. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, en donde a un bajo valor de pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias (Ouwehand, 1998). Es uno de los agentes antimicrobianos más conocidos que inhibe a *Clostridium botulinum*, *C. perfringes*, *C. sporogenes*, *L. monocytogenes*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* y *Yersinia enterocolitica* (Juneja y Sofos, 2002).

Ambos ácidos láctico y acético y sus sales son generalmente reconocidos como seguros por la FDA en los Estados Unidos. El ácido acético y sus sales presentan su actividad antimicrobiana a valores de pH 4.5 y el efecto se debe a la disociación de moléculas (Juneja y Sofos, 2002). En contraste con la mayoría de los ácidos orgánicos, el ácido acético es generalmente más efectivo contra levaduras y bacterias. Las bacterias que inhibe incluye a los géneros *Bacillus spp*, *Clostridium spp*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* y *Salmonella spp*. Juneja y Sofos (2002) reportan que una concentración de ácido acético al 0.1% es bacteriostático para *E. coli* O157:H7, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *Aeromonas hydrophila*, no mostrando el mismo efecto con cepas de *Bacillus cereus* y *S. aureus* a la concentración antes mencionada.

El peróxido de hidrógeno es producido por BAL en presencia de oxígeno como consecuencia de la acción enzimática de la flavoproteína oxidasa o (NADH) y de la peroxidasa (Kong y Davidson, 1980). Sin embargo, la presencia de este metabolito no es deseable en algunos alimentos debido a que es una sustancia oxidante que puede ocasionar decoloraciones, sabores desagradables o degradación de nutrientes. Muchas bacterias fermentadoras producen peróxido de hidrógeno como un mecanismo protector contra el oxígeno. El peróxido de hidrógeno producido por las BAL es inhibidor de bacterias, Gram negativas como *Pseudomonas spp* y Gram positivas como *S. aureus*. El H_2O_2 es más efectivo como esporicida que bactericida (González y col., 2005). Algunas especies como *L. lactis* y *L. cremoris* pueden producir

H₂O₂ cuando se transfieren de condiciones anaerobias a aerobias (González y col., 2005).

El dióxido de carbono es producido principalmente por las BAL heterofermentativas. Puede ejercer efecto antimicrobiano de varias maneras en un medio ambiente más anaeróbico por inhibición enzimática, descarboxilación y por ruptura de la membrana celular con acumulación de gases en la fase de la bicapa lipídica, originando una difusión en la permeabilidad (González y col., 2005).

El diacetilo (2,3 butanodiol) es producido por cepas de todos los géneros de BAL por la fermentación de citrato y por ciertas especies de BAL a partir del piruvato. Este inhibe el crecimiento de bacterias Gram negativas contrarrestando la utilización de la proteína fijadora de arginina; de Gram positivas parece ser debida a que carecen de proteínas periplásmicas fijadoras similares y a que poseen mayor reserva de aminoácidos y también inhibe el crecimiento de levaduras. Produce el sabor a mantequilla en productos fermentados y en algunos alimentos es usado como aditivo. El diacetilo interfiere con la utilización de la arginina por reacción con la arginina ligada a proteínas de organismos Gram negativos (Jay, 2000).

Ácidos grasos. Algunos *Lactobacillus* y *Lactococcus* muestran actividad lipolítica y bajo ciertas condiciones producen concentraciones significativas de ácidos grasos, los cuales muestran actividad antimicrobiana. En muchos casos los ácidos grasos mejoran las características sensoriales de los alimentos fermentados. Los ácidos grasos insaturados son activos contra bacterias Gram positivas (Wood y Holzapfel, 1995).

Bacteriocinas. En la actualidad, un gran número de bacteriocinas han sido identificadas y caracterizadas en distintos grupos de acuerdo con su peso molecular y estabilidad al calor, mostrando un amplio o reducido campo de acción antimicrobiano según su medio (Cintas y col., 2001). El campo de

acción de estas bacteriocinas ha sido estudiado en productos donde hay uso de bacterias lácticas en los procesos de producción, dejando un amplio escenario de alimentos sin evaluar, incrementando la posibilidad del uso de bacteriocinas como conservador natural.

2.2 BACTERIOCINAS

Las bacteriocinas se definen como sustancias proteicas antimicrobianas producidas por un gran número de especies bacterianas. Estas sustancias constituyen un grupo heterogéneo de péptidos sintetizados en el ribosoma con mas de 60 aminoácidos y pueden ser péptidos de moléculas elongadas o péptidos de moléculas globulares con un amplio rango de peso molecular, que varían mucho en su espectro antimicrobiano, propiedades bioquímicas, mecanismo de acción y características genéticas (Fimland y col., 1996).

La actividad antimicrobiana y su estructura proteica, probablemente sean las únicas características comunes a todas ellas (Stiles y Holzapfel, 1997). El término "bacteriocinogenicidad" se emplea para describir la capacidad de las bacterias de sintetizar y eliminar al exterior proteínas antagonistas del desarrollo de otros microorganismos (Delves-Broughton, 1991). Estas sustancias se detectaron por primera vez en *E. coli* y más tarde en algunas bacterias Gram positivas (Fimland y col., 1996).

2.2.1. CLASIFICACIÓN

La clasificación de estos compuestos se basa en las características bioquímicas y genéticas (González y col., 2003). Algunos ejemplos de bacteriocinas se mencionan en la tabla 4.

Tabla 4. Bacteriocinas y microorganismos productores

Bacteriocina	Clase	Microorganismo productor
Nisina	I	<i>Lactococcus lactis subsp. lactis</i>
Pediocina PA-1	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Lactobacillus plantarum</i> WHE92
Pediocina JD	IIa	<i>Pediococcus acidilactici</i> JD1-23
Sakacina A	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> 706
Sakacina P	IIa	<i>Lactobacillus sake</i> LTH673
Curvacina A	IIa	<i>Lactobacillus curvatus</i> LTH 1174
Mesentericina Y105	IIa	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Plantaricina E/F	IIb	<i>Lactobacillus plantarum</i> C11
Lactococcina A	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i>
Lactococcina B	IIb	<i>Lactococcus lactis subsp. cremoris</i> 9B4
Lactacina F	IIb	<i>Lactobacillus johnsonii</i>
Divergicina	IIc	<i>Carnobacterium divergens</i> LV13
Helveticina	III	<i>Lactobacillus helveticus</i>

Clase I. Lantibióticos.- Son péptidos pequeños policíclicos (< 5 KDa) con poca estabilidad al calor, activos a nivel de membrana y contienen algunos aminoácidos modificados poco comunes como lantionina, β-metil-lantionina y dihidroalanina que se forman debido a modificaciones posteriores al proceso de la traducción (Cintas y col., 2001). Un ejemplo bien conocido de estas bacteriocinas es la nisina.

Clase II. No lantibióticos.- Son bacteriocinas de peso molecular variable, pequeñas (<10 KDa), pero mayores a 5 KDa (Cintas y col., 2001). En este grupo se pueden identificar tres subclases:

- Clase IIa.- Son péptidos activos contra *Listeria*, tienen la secuencia en la región N-terminal TGNGVXC y sus representantes característicos son la pediocina PA-1 y la sakacina P (Cintas y col., 2001).

- Clase IIb.- Son formadores de complejos de poración que consisten de dos péptidos diferentes. Ambos péptidos son necesarios para una mejor actividad antimicrobiana, en este grupo se encuentran la lactococcina G y las plantaricinas EF y JK (Cintas y col., 2001).

- Clase IIc.- Son péptidos pequeños, termoestables, no modificados y que se transportan mediante péptidos líder. En esta subclase solamente se reportan las bacteriocinas divergicina A y acidocina B (Cintas y col., 2001).

Clase III.- Son péptidos grandes mayores (>10 KDa) e inestables al calor. En esta clase se encuentran las helveticinas J y V, acidofilicina A, lactacinas A y B (Cintas y col., 2001).

2.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN

Las bacteriocinas producidas por las BAL tienen sitios “blanco” en los microorganismos sensibles (Tabla 5). El modo de acción de las bacteriocinas es complejo; el modo de acción propuesto para las bacteriocinas es una unión inicial a la membrana bacteriana por atracción electrostática entre los lípidos cargados negativamente y las bacteriocinas con su carga neta positiva localizada fundamentalmente en uno de sus extremos (extremo C-terminal de la nisina, extremo N-terminal de la pediocina) (Wood y Holzapfel, 1995). A continuación se produciría la inserción de las bacteriocinas en la bicapa lipídica, en el caso de la nisina esta inserción se realiza por su extremo N-terminal (Moll y col., 1999) y en el caso de la pediocina, a través de su α -hélice transmembranal del extremo C-terminal (Ennahar y col., 2000).

La nisina pertenece a la clase I y la pediocina a la clase II; estas bacteriocinas han sido las más estudiadas y comparten algunas características.

Tabla 5. Bacteriocinas producidas por BAL y microorganismos sensibles

Organismo productor	Bacteriocina	Microorganismos sensibles
<i>Lc. cremoris</i>	Lactoestrepicina 5	<i>Lc. lactis</i> <i>Bacillus subtilis</i>
<i>Lb. acidophilus</i>	Lactacina Lactacina B	<i>S. aureus</i> y <i>S. epidemidis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Streptococcus faecalis</i> <i>Salmonella enteritidis</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Mycobacterium sp.</i> <i>Lactobacilli</i>
<i>Lactobacillus sp.</i>	Sin nombre	<i>Clostridium</i> <i>B. cereus</i> <i>Clostridium sporogenes</i>
<i>Lb. saké</i>	Sakacina A	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lb. bulgaricus</i>	Bulgaricina	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>S. aureus</i> <i>Lc. lactis</i>
<i>Lc. lactis</i>	Nisina	<i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>C. botulinum</i>
<i>P. acidolactici</i>	Pediocina Ach Pediocina PA-1	<i>Lb. plantarum</i> <i>L. monocytogenes</i> <i>S. aureus</i> <i>C. perfringes</i>
<i>P. pentosaceus</i>	Pediocina A	<i>S. aureus</i> <i>C. botulinum</i> <i>L. monocytogenes</i>

Los péptidos se unen a la membrana citoplasmática a través de uniones electrostáticas con los fosfolípidos cargados negativamente (Figura 1), luego se insertan a la membrana con una orientación que depende del potencial de membrana, el cual está influenciado por el pH. Los monómeros de bacteriocina forman agregados que resultan en la formación de poros con la consecuente salida de iones, pérdida de la fuerza motriz de protones (FMP), salida de ATP y aminoácidos, dando como resultado la muerte celular (González y col., 2003).

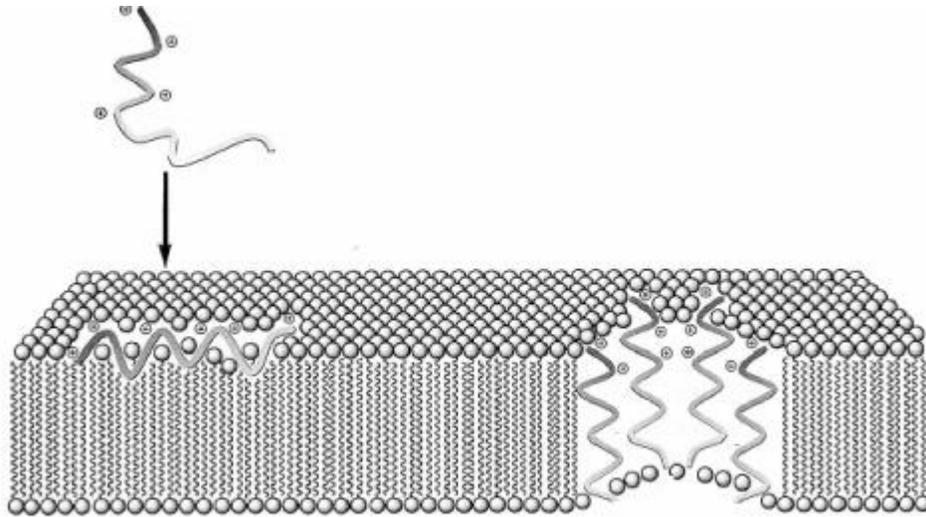


Figura 1: Mecanismo de acción de las bacteriocinas por formación de poros en la membrana citoplasmática.

Aunque es común la formación de poros y la disipación de la FMP en el modo de acción de las bacteriocinas, existen algunas particularidades en cada clase. De la clase I, la nisina no requiere de un receptor unido a la membrana de la célula "blanco" ya que reconoce la composición fosfolipídica de la célula. En cambio, para la acción de la lactococina A y la lactoestrepcina se requiere de la unión a receptores membranales. Para las bacteriocinas de la clase IIa se ha sugerido que la región amino terminal tiene un papel importante en la capacidad de reconocimiento de la membrana de la célula "blanco". En las de la clase IIb, las plantaricinas EF y JK dependen de la acción de dos péptidos para la formación de poros y consecuente disipación del potencial de membrana (González y col., 2003).

Considerando la diferencia en peso molecular se entiende que cada bacteriocina es diferente y que su uso en la industria alimentaria como conservador, depende del microorganismo de deterioro o patógeno que se desea controlar (Grande y col., 2005). La composición y distribución de los fosfolípidos de la membrana celular influye en la eficiencia de la asociación de la bacteriocina con el citoplasma, su inserción y la formación del poro, es por

este fenómeno que se debe la resistencia de los microorganismos a las bacteriocinas (Cintas y col., 2001). La actividad antibacteriana se pronuncia en la fase logarítmica temprana y la fase estacionaria (Ogunbanwo y col., 2003), por lo que a la hora de aplicar las bacteriocinas a un alimento a partir de un cultivo iniciador o para su purificación, es importante considerar que las etapas de velocidad máxima de producción de la bacteriocina es la fase log, con el fin de aumentar la efectividad del proceso de acción de estos compuestos ante microorganismos de deterioro o patógenos importantes (Pal y col., 2005). Las bacterias productoras de bacteriocinas se auto protegen de la toxicidad de estos compuestos mediante la expresión de una proteína de inmunidad específica codificada normalmente en el mismo operón de la bacteriocina, todo esto regulado por un sistema de transducción de señal de tres componentes (Cintas y col., 2001). Así, la bacteria puede seguir reproduciéndose y liberando más compuestos bioconservadores en el alimento, lo cual da estabilidad al producto y logra periodos de vida útil amplios. Según Cintas y col. (2001), el uso de mezclas de bacteriocinas reduce la frecuencia con la que los microorganismos desarrollan resistencia. Esto evidencia la necesidad de realizar investigaciones sobre la acción y la mejor mezcla de bacteriocinas, con el mayor espectro de acción posible tanto a nivel de variedad de microorganismos como a nivel de tipos de productos alimenticios.

Otro aspecto importante en la acción de las bacteriocinas es la presencia de iones como Mg^{+2} y Ca^{+2} los cuales neutralizan la carga negativa de los fosfolípidos. Esto induce a una condensación fosfolipídica que incrementa la rigidez de la membrana citoplasmática evitando la acción antimicrobiana de la bacteriocina (Rodgers, 2001). La membrana externa de las bacterias Gram negativas, contiene lipolisacáridos y no fosfolípidos, que actúan como una barrera permeable contra macromoléculas y solutos hidrofobicos como las bacteriocinas, esto las hace más resistentes y tiende a que los investigadores manifiesten que las bacteriocinas ejercen su acción ante bacterias Gram positivas (Rodgers, 2001). Sin embargo, Elegado y col. (2005), encuentran en su estudio sobre el espectro de acción de *Lb. plantarum* BS que la bacteriocina de esta bacteria láctica puede actuar ante bacterias Gram negativas. Esto

permite considerar la acción de las bacteriocinas ante un espectro más grande de microorganismos deterioradores presente en la industria alimentaria. La inactivación de bacterias Gram negativas puede aumentarse con la adición de quelantes, los cuales hacen permeable la membrana a las bacteriocinas (Rodgers, 2001).

El espectro de acción reducido es cuando el efecto de la bacteriocina se confina hacia especies relacionadas con el ambiente de la bacteria productora (Joerger, 2002). Por otro lado Bizani y col. (2005) demuestran en su estudio que el número de células viables decrece conforme aumenta la concentración de bacteriocina, por ello es importante determinar la concentración a la cual la bacteriocina será efectiva ante el control de crecimiento microbiano en la industria alimenticia. Además, las bacteriocinas pueden ejercer un efecto sinérgico con tratamientos como presiones hidrostáticas (HP), los cuales en combinación son efectivos para el control de bacterias Gram negativas y Gram positivas, esto debido a causa del daño en la membrana y en la pared celular (Kalchayanand y col., 2004).

La actividad de las bacteriocinas en alimentos está altamente influenciada por diferentes factores como composición de los alimentos, interacción con los componentes, estabilidad de la bacteriocina, pH y temperatura de almacenamiento, por ello es muy importante identificar la bacteriocina que realmente puede ejercer un efecto de conservación en un alimento y las condiciones bajo las cuales puede tener actividad antimicrobiana (Grande y col., 2006). El crecimiento de la cepa productora de la bacteriocina a la temperatura óptima, usualmente da como resultado una producción óptima de la bacteriocina. Algunas BAL producen más de una bacteriocina, las cuales pueden ser aisladas cambiando las condiciones de crecimiento como son temperatura y pH, como lo observaron Krier y Revol-Junelles (1998) al aislar las bacteriocinas mesenterocina 52A y 52B que produce la cepa *Lc. mesenteroides* sp. *mesenteroides* FR52.

2.2.3 PRODUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN

Algunas de las bacteriocinas son producidas durante la fermentación de alimentos. A pesar de que la principal causa de conservación de un alimento fermentado es la reducción de pH por la formación de ácidos, las bacteriocinas juegan un papel importante como factor de conservación (Ogunbanwo y col., 2003). La producción máxima de bacteriocinas puede obtenerse suplementando un medio de cultivo con factores limitantes de crecimiento como azúcares, vitaminas y fuentes de nitrógeno, regulando el pH y eligiendo las mejores condiciones del medio para aumentar la eficiencia del proceso. Al suplementar el alimento o el medio con nutrientes adicionales como levadura, se incrementa en gran proporción la cantidad de bacteriocina producida, lo que permite pensar en la posibilidad de extracción de estos productos para la posterior aplicación en la industria alimentaria (Ogunbanwo y col., 2003).

Es de acuerdo con el tipo de alimento que se pretende conservar con bacteriocinas, que deberá ser su almacenamiento, para lograr que todos los efectos en conjunto permitan la aplicación efectiva de estos bioconservadores, lo que podría requerir de la combinación con otros métodos de conservación como refrigeración, un método utilizado para extender la vida útil de alimentos perecederos como lácteos y carnes, siendo la *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas* ejemplos importantes de microorganismos que causan deterioro en refrigeración y que deben controlarse (Rodgers, 2001).

Generalmente las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas son termoresistentes, lo que les permite mantener su actividad antimicrobiana a temperaturas similares a la pasteurización y esterilización de la leche. Esto sugiere que su actividad recae en estructuras pequeñas y poco complejas, probablemente sin estructura terciaria (Piard y Desmazeuau, 1992). Sin embargo, la helveticina J y las bacteriocinas de *Lb. casei* y *Lb. delbrueki* son muy sensibles al calentamiento, indicando que poseen una estructura proteica más compleja. (Toba y col., 1991).

Las bacteriocinas se inactivan al menos por un enzima proteolítico, entre los que conviene citar los de origen pancreático (tripsina y alfa-quimiotripsina) y

gástrico (pepsina) (Lewus y col., 1991). Algunas bacteriocinas son sensibles a otros enzimas como lipasas, amilasas y fosfolipasas, lo que indica la heterogeneidad de las bacteriocinas y la influencia de los compuestos no proteicos en su estructura y actividad (Jiménez y col., 1993). Las bacteriocinas son generalmente estables a pH ácido o neutro, aunque existen excepciones interesantes; la bacteriocina aislada de *Lc. lactis* mostró actividad y estabilidad a valores de pH de 2-11 hasta 10 min/10°C (Lewus y col., 1991).

Teniendo claro todos los factores involucrados, la caracterización bioquímica es necesaria previa a la aplicación comercial e identificar el gen codificante de la bacteriocina, lo que permite establecer las condiciones necesarias para la aplicación efectiva de estos productos (Elegado y col., 2005). Fimland y col. (1996) muestran en su estudio, la secuencia de aminoácidos para varias bacteriocinas, lo cual permite caracterizar y conocer el porque del comportamiento diferente entre bacteriocinas o inclusive de una misma bacteriocina a distintos microorganismos.

Diversos investigadores han utilizado el método de degradación de Edman para determinar la secuencia de aminoácidos de la bacteriocina, método utilizado para caracterizar bacteriocinas, debido a que es un método de secuenciación de aminoácidos en un péptido. En este método, el residuo amino-terminal se separa del péptido sin afectar a los enlaces peptídicos entre los otros residuos. En medio básico, se provoca la reacción del extremo amino con fenilisotiocianato para formar un péptido feniltiocarbamilado. A continuación, se aplica un medio ácido para que el tiocarbamoilo forme un ciclo de 5 miembros (feniltiohidantoina) con el carbonilo del enlace peptídico adyacente. De este modo, se obtiene un péptido más corto, con un nuevo extremo amino y la feniltiohidantoina del primer aminoácido. La secuencia de aminoácido, obtenida por la degradación de Edman de la bacteriocina lactococcina MMFII, producida por *Lactococcus lactis* (Ferchichi y col., 2001), reveló un aminoácido con dos residuos de cistina en las posiciones 9 y 14 y una masa calculada de 4144.6 Da. El análisis de espectrometría dio una masa molecular de 4142.6, sugiriendo la presencia de un enlace de disulfuro dentro de la bacteriocina purificada.

2.2.4 MÉTODOS DE PURIFICACIÓN

Las bacteriocinas pueden ser utilizadas como conservador de manera purificada o semipurificada. El primer paso que se requiere para la purificación de las bacteriocinas se refiere a la concentración del sobrenadante, asumiendo un proceso optimizado de producción de bacteriocinas (Svetoslav y col., 2004). Algunas de ellas se encuentran en agregados moleculares, induciendo a errores en la determinación del peso molecular de la bacteriocina. Estas macromoléculas se disgregan usando agentes que disocian las macromoléculas, ultrafiltración o eliminando material lipídico por la extracción con metanol-cloroformo o etanol-dietil éter; después las bacteriocinas del supernadante pueden ser concentradas de acuerdo con su tamaño mediante filtración, precipitación con sales de sulfato de amonio y extracción con solventes orgánicos como butanol y etanol (Svetoslav y col., 2004).

La naturaleza catiónica e hidrofóbica de las bacteriocinas, permite recolectarlas de caldos complejos de fermentación que contienen altos niveles de péptidos. La purificación inicia desde el crecimiento de la bacteria en un medio líquido conveniente y bajo óptimas condiciones, removiendo las células por centrifugación y precipitando la proteína con la adición de sulfato de amonio, seguido de varios pasos de cromatografía (Cintas y col., 2001). Se han desarrollado otros métodos con separaciones por cromatografía y de acuerdo al pH del medio donde logran una total liberación o adsorción de la bacteriocinas dentro de la célula. El método más común utilizado es la precipitación con sulfato de amonio seguido de una cromatografía HPLC (Svetoslav y col., 2004).

Estos procedimientos dan buenos resultados en términos de rendimiento y purificación, pero son inconvenientes para una recolección y purificación de bacteriocinas a gran escala; para esto se han desarrollado métodos basados en adsorción y desorción. En un estudio realizado por Yang y col. (1992), se demostró que las bacteriocinas pueden ser recolectadas por adsorción sobre las células productoras a pH 6.0-6.5, seguido por una separación de las células y desorción a pH 2.0 con NaCl 0.1M. Este método fue efectivo para las

bacteriocinas pediocina AcH, nisina, sakacina A y leuconocina Lcm1, aunque para otras la recolección fue limitada (Hoover y Harlander, 1993).

Las bacteriocinas pueden ser adsorbidas con HCl y con resinas de intercambio catiónico, como lo observaron Stoffels y col. (1993), al utilizar un protocolo muy sencillo de purificación que incluye la adsorción con HCl y resinas de intercambio catiónico, este método fue usado para purificar los lantibióticos nisina y carnocina UI49 donde la recolección fue casi del 100% y la purificación fue mayor para carnocina UI49 con respecto a la nisina.

2.2.5 IMPORTANCIA DE LAS BACTERIOCINAS EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA

El empleo de bacterias productoras de bacteriocinas como cultivos iniciadores para la producción de alimentos fermentados, así como la adición directa de las bacteriocinas a los alimentos y a las bebidas, ofrece una nueva forma de conservación y se ha facilitado en la medida en que se tiene mayor conocimiento de sus propiedades físicas, bioquímicas y genéticas, así como las características inherentes de los alimentos en los cuales son usados. También es posible que el espectro de actividad de estas bacteriocinas pueda ser ampliado al combinarlas con agentes quelantes, como ha sucedido con la nisina cuando se combina con el EDTA. Diversos estudios han mostrado la efectividad *in vitro* de las bacteriocinas contra bacterias indeseables, y cuando son producidas como parte de la fermentación retienen su actividad antimicrobiana (Zúñiga, 2000; Rodríguez, 2003).

La bacteriocina más conocida del grupo I es la nisina, producida por *Lc. lactis spp lactis*, la cual tiene un amplio espectro de actividad antimicrobiana hacia las bacterias Gram positivas, incluyendo *S. aureus* y *L. monocytogenes*. Esta bacteriocina previene la esporulación y células vegetativas de *Bacillus spp* y *Clostridium spp*. (González y col., 2003). Su aplicación ha sido muy estudiada y ya ha sido aceptada como conservador ante FDA y el Codex Alimentarius. Algunos productos en los cuales se ha implementado el uso de

bacteriocinas, específicamente la nisina, son especialmente productos lácteos como el queso Gouda y queso Emmenthal donde la nisina inhibe el crecimiento de *Cl. butyricum* y *Cl. tyrobutyricum*. En el yogurt se da una inhibición del cultivo iniciador *Lb. delbrueckii spp bulgaricus* y *S. thermophilus* por la nisina (Delves-Broughton, 1991), por lo que se comprueba que no cualquier bacteriocina puede ser aplicada como conservador en alimentos.

Otra aplicación de las bacteriocinas es en alimentos enlatados como hongos, maíz, zanahoria, para el control de termófilos esporulados, por ser productos de baja acidez que reciben un tratamiento térmico mínimo (Delves-Broughton, 1991). Para alimentos cárnicos, las bacteriocinas pueden llegar a sustituir el uso de nitritos, sin embargo es necesario determinar la bacteriocina adecuada que no requiera de una elevada concentración de aplicación. En productos marítimos, retoma importancia debido a que, tanto en empaque al vacío como en atmósfera modificada tienen un alto riesgo de *Cl. botulinum*, el uso de bacteriocinas ha demostrado ser efectivo en productos como langosta en el control de *L. monocytogenes* (Delves-Broughton, 1991). Otro estudio en el que se ha evidenciado el efecto de una bacteriocina como enterocina, es el descrito por Grande y col. (2005), donde evidencian el control de *Alicyclobacillus acidoterrestris* en jugo de frutas como manzana, pera, naranja y uvas, obteniendo una estabilidad hasta de 14 días a temperatura de 37 °C.

2.2.6 ELEMENTOS DE EFECTIVIDAD

Existen diversos factores a considerar antes de adicionar directamente las bacteriocinas a los alimentos, uno de ellos es su composición. Algunos estudios han demostrado que las bacteriocinas, incluyendo la nisina, se unen a las grasas, interfiriendo en su actividad contra algunas bacterias. La temperatura, el pH y la presencia de enzimas son condiciones críticas para la estabilidad de las bacteriocinas en alimentos y bebidas. Debido a los estrechos intervalos de pH en los cuales son activas algunas bacteriocinas, deben ser usadas en alimentos y bebidas con valores de pH similares que aseguren máxima

actividad. Muchas bacteriocinas de BAL son generalmente proteínas pequeñas, estables al calor, favoreciendo así su uso en alimentos procesados térmicamente (Nettles y Barefoot, 1993).

El cultivo de estas bacterias, denominado cultivo protector, debe sobrevivir en productos en refrigeración y ser capaz de crecer y ejercer un efecto antagónico a las temperaturas deseadas, si el producto se va a someter a cocción, se debe considerar la resistencia al calor del cultivo protector. La producción de bacteriocinas y su actividad dependen de la temperatura de incubación, considerando, además, la sensibilidad al calor de los microorganismos de deterioro o patógenos que se desea controlar (Rodgers, 2001).

Otro elemento importante en la efectividad del efecto antimicrobiano de la bacteriocina, es el tamaño de inoculación que impacta no solo la velocidad de desarrollo de los factores de conservación, sino la calidad sensorial del producto y el costo del método. Este tamaño depende a la vez del medio en el cual se inocular, la etapa del microorganismo de deterioro y patógenos y la identidad del cultivo protector. La composición y estructura del alimento tiene un significativo efecto dinámico y factores de interacción importantes, los ingredientes presentes puede favorecer o inhibir la acción de la bacteriocina como la glucosa o ácidos. Un valor bajo de pH puede favorecer la producción de bacteriocinas e incrementar su actividad (Elegado y col., 2005).

La estructura del alimento ejerce un efecto dinámico en el crecimiento de las bacterias y la difusión de las sustancias inhibitorias. Se ha visto para algunas bacteriocinas que los componentes de los alimentos protegen a la bacteriocina durante procesos de calor (Bizani y col., 2005). Es importante la optimización de la concentración de bacteriocina para el control efectivo de bacterias patógenas durante la conservación de los alimentos, una concentración muy baja puede tener efecto antimicrobiano al inicio de la inoculación pero que decaería rápidamente, lo cual impide tener periodos de vida útil importantes (Elegado y col., 2005). Las bacteriocinas ejercen su poder antimicrobiano ante microorganismos relacionados o presentes en su ambiente, esto hace que los microorganismos de deterioro o patógenos puedan

presentar distintos comportamientos ante la presencia de la bacteriocina (Grande y col., 2006). Algunos microorganismos pueden ser sensibles; mientras que, otros, son resistentes a la acción de las bacteriocinas, inclusive una cepa que parece ser sensible puede tener células que presenten resistencia a la acción de la bacteriocina, las mismas bacterias productoras de bacteriocinas pueden ser sensibles a la acción de otra bacteriocina y por último, células de esporas que presentan resistencia a la bacteriocina, pueden volverse sensibles después de la esporulación (Cintas y col., 2001).

El campo de acción de las bacteriocinas se relaciona con el contenido de cistina y de acuerdo con ello, se establecen tres grupos: bacteriocinas con un estrecho rango de acción, restringido a microorganismos de la misma especie; bacteriocinas con un rango intermedio que inhibe bacterias lácticas y algunas bacterias Gram positivas y bacteriocinas con amplio rango de acción, las cuales inhiben una amplia variedad de Gram positivas (Cintas y col., 2001).

Ya que las bacteriocinas son proteínas, son susceptibles a proteasas endógenas o proteinasas presentes en el alimento y deben ser evaluadas cuidadosamente en cuanto a la retención de su actividad. Mientras que la degradación de estos compuestos es indeseable en sistemas alimenticios, la inactivación por enzimas digestivas, tales como quimotripsina o tripsina es ventajosa. La inactivación por estas enzimas proporciona bacteriocinas inertes y puede explicar por qué no se han asociado efectos adversos a la ingestión de bacteriocinas (Hoover y Harlander, 1993).

Las bacteriocinas pueden estar presentes en sistemas alimenticios como productos de la fermentación de los cultivos iniciadores. Algunos estudios demuestran que las bacterias productoras de bacteriocinas empleadas como cultivos iniciadores pueden ser útiles para controlar la contaminación por bacterias indeseables durante la fermentación (Kato y col., 1994).

Una salsa preparada usando *P. acidilacti* H como cultivo iniciador no causó efectos adversos para los consumidores, posiblemente debido a la inactivación de la bacteriocina pediocina Ach por quimotripsina y tripsina que se localizan en el tracto digestivo. Esta información indica que la bacteriocina puede ser

consumida sin efectos tóxicos y, por lo tanto, puede ser adecuada para aplicaciones en alimentos (Hoover y Harlander, 1993).

Antes de que otras bacteriocinas sean usadas como aditivos en alimentos, serán necesarios amplios estudios toxicológicos, como los llevados a cabo con la nisina. El uso de las bacteriocinas deberá ser práctico, barato y no deberá afectar las características sensoriales de los alimentos en los cuales se adicionen (Nettles y Barefoot, 1993). El uso de cultivos iniciadores bacteriocinogénicos o el desarrollo de cultivos iniciadores manipulados genéticamente son alternativas potenciales para mejorar la calidad total y seguridad de los alimentos (Zúñiga, 2000).

La demostración de la actividad de las bacteriocinas bajo condiciones controladas de laboratorio puede ser directa, pero probar su eficacia como antimicrobianos en sistemas alimenticios constituye un mayor reto.

III. JUSTIFICACIÓN

Durante los últimos años, el consumidor se ha vuelto más exigente en cuanto a calidad y expectativas de un producto saludable y fresco. Para satisfacer al consumidor es necesario investigar y encontrar opciones que permitan obtener alimentos que ofrezcan ciertas características, como es el caso de alimentos donde la tendencia es eliminar el uso de conservadores y obtener productos más naturales. Las bacteriocinas han atraído la atención como sustituto potencial de compuestos conservadores porque son producidas por bacterias consideradas benéficas para la salud y son empleadas en la producción de alimentos. El aislamiento y caracterización de cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) productoras de bacteriocinas, cuya actividad fermentativa sea paralela con la actividad para inhibir microorganismos patógenos y deterioradores presentes en el proceso de elaboración mediante la producción de bacteriocinas, permitirá incrementar el conocimiento acerca del potencial de cepas de BAL autóctonas con propiedades bacteriocinogénicas, como cultivos iniciadores para la obtención de productos lácteos.

IV. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL:

Purificar y caracterizar parcialmente, una proteína tipo bacteriocina, obtenida de una cepa de *Lactobacillus plantarum*.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Realizar la purificación parcial de la proteína tipo bacteriocina
2. Realizar la caracterización parcial de la proteína tipo bacteriocina obtenida.

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y EQUIPOS

5.1.1 MATERIAL DE VIDRIO Y DESECHABLE:

- Material propio de un laboratorio de microbiología.

5.1.2 EQUIPOS

- Incubadora (Ríos Rocha, Bacteriológica Blue M. México)
- Autoclave (Yamato, TX994C. Japón)
- Baño maría (Cole-Parmer, KH12110-00. EUA)
- Centrifuga (Hermle, Z160M. EUA)
- Refrigerador (Daigger, TX3346A, EUA)
- Campana de Bioseguridad (Labconco, Purifier Clas II. EUA)
- Micropipetas (Transferpette GSA, TX205507K. EUA)
- Membranas de diálisis (Spectra/Por 3, MWCO: 3500. EUA)
- Espectrofotómetro (Thermospectronic, Genesis 20. EUA)
- Cámara de electroforesis (Labconco, Gel Dryer 7313A. EUA)
- pHmetro (Denver instrument, Ultrabasic UB-10. EUA)

5.1.3 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Man Rogosa y Sharpe (Merck)
- Caldo Man Rogosa y Sharpe (Merck)
- Agar y caldo MRS modificado: los ingredientes son los mismos que se emplearon en la preparación del agar y caldo MRS de marca Merck, suprimiendo el extracto de carne y el carbohidrato (D(+)-glucosa).
- Agar soya tripticaseína (Bioxon)
- Caldo soya tripticaseína (Bioxon)

5.1.4 REACTIVOS

- Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 60% (SIGMA)
- Fosfato monoácido de sodio Na_2HPO_4 0.1 M (SIGMA)
- Fosfato diácido de potasio KH_2PO_4 0.1 M (SIGMA)

- Fosfato de sodio Na_3PO_4 5 Mm (SIGMA)
- Metanol CH_3OH (SIGMA)
- Polietilenglicol PEG (Hibry-Max)
- Agua destilada
- Cloruro de sodio NaCl 100 mM (SIGMA)
- Tripsinogeno de páncreas de bobino (CIQA)
- Tripsina de soya (CIQA)
- Lactoalbumina de leche de bovino (CIQA)
- Albúmina bovina sérica BSA (CIQA)
- Solución colorante azul de Bromofenol 0.1% (Anexos)
- Soluciones PAGE-SDS (Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)
 1. Solución de monómeros (30% T 2.7 C_{bis}) (Anexos)
 2. Regulador de gel separador (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8) (Anexos)
 3. Regulador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8) (Anexos)
 4. Dodecilsulfato de sodio (SDS al 10%)
 5. Persulfato de amonio (APS) al 10% (iniciador)
 6. TEMED $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_3$ (N,N,N'-tetrametiletlenodiamina)
 7. Regulador de lavado (Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%)(Anexos)
 8. Regulador del tratamiento de muestras 2x(Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol al 10%)(Anexos)
 9. Regulador de corrimiento (Tris-0.025 M pH 8.3, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%)(Anexos)
- Solución colorante Azul de Coomassie R-250
 1. Solución madre (azul de Coomassie al 1%)
 2. Solución colorante para tinción (Azul de Coomassie 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%)(Anexos)
 3. Solución decolorante I (metanol 50%, ácido acético 10%)(Anexos)
 4. Solución decolorante II (ácido acético 7%, metanol 5%)(Anexos)
 5. Solución conservadora (ácido acético al 7%)

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 ORIGEN DE LA CEPA BAL

La cepa de *Lb. plantarum*, se obtuvo a partir del aislamiento de BAL de productos lácteos en un trabajo previo realizado por Clavel (2006); fue identificada bioquímicamente por Ortiz (2006) y posteriormente se le realizaron pruebas en donde mostró capacidad inhibitoria contra microorganismos deterioradores y patógenos en un trabajo de investigación realizado por Neria (2006). Por lo anterior, se utilizó esta cepa para fines propios del presente trabajo.

Esta cepa fue clasificada como 110 *Lb. plantarum*. Actualmente se encuentra liofilizada y forma parte del banco de cepas ubicado en el Laboratorio de Biotecnología del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado del Hidalgo (Clavel, 2006).

5.2.2 PURIFICACIÓN PARCIAL DE LA PROTEÍNA TIPO BACTERIOCINA

Para los estudios de la purificación parcial de la bacteriocina fue necesaria la reactivación de la cepa 110 *Lb. plantarum*. Esto se realizó adicionando 5 mL de caldo MRS estéril a la ampollita de la cepa para hidratar el liofilizado; se dejó reposar 10 min y se homogeneizó por agitación suave durante 1 min, de la cepa rehidratada, se tomó una alícuota de 1 mL que se inoculó en un tubo con 10 ml de caldo MRS y se incubó a 37°C/24 h.

5.2.2.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO

Una vez obtenida una suspensión bacteriana densa de la cepa 110 *Lb. plantarum* se tomaron 5 mL de inóculo que se agregaron a un frasco con 1 L de caldo MRS, el cual se cultivó 18 h/37°C. Posteriormente se centrifugó a

5000 rpm durante 15 min/4°C, se recuperó el sobrenadante y se desechó el precipitado obtenido (células); a esta fracción se le denominó extracto crudo. En condiciones de refrigeración y con agitación, al extracto crudo se le añadió poco a poco sulfato de amonio al 60% hasta saturación y se dejó durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, se centrifugó a 5000 rpm por 15 min para separar y recuperar el precipitado, el cual fue resuspendido en aproximadamente 100 mL de regulador de fosfatos 0.1 M a pH 7. Después se dializó contra 2 L de regulador de fosfatos 0.1 M a pH 7 durante 24 h, haciendo cambios cada 12 h en membranas de diálisis (Spectra/Por 3, MWCO: 3500). Posteriormente los tubos de diálisis se colocaron sobre una capa de polietilenglicol (PEG) a temperatura ambiente para concentrar las muestras hasta el mínimo volumen debido a la deshidratación producida por el PEG. A esta fracción se le denominó extracto parcialmente purificado.

5.2.2.2 ELECTROFORESIS EN GEL (PAGE-SDS) DEL EXTRACTO PARCIALMENTE PURIFICADO

Una vez que las muestras se concentraron, se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (PAGE-SDS) al 10%, de acuerdo con la técnica descrita por Laemmli (1970), en condiciones desnaturizantes. Se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se colocan en un gel, a través del cual se hace pasar una corriente de 15 mA, por 5 h en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas). Se utilizaron las condiciones descritas en la Tabla 6. La electroforesis en PAGE-SDS se realizó para la determinación de la pureza de las muestras parcialmente purificadas, así como de su peso molecular, comparando con marcadores de peso molecular conocido, que fueron tripsinógeno de páncreas de bovino (24,000 Da), inhibidor de tripsina de soya (20,000 Da) y lactalbúmina de leche de bovino (14,200 Da).

Tabla 6. Condiciones del gel de electroforesis

SOLUCIONES	GEL SEPARADOR (10%T, 2.7%C)	GEL CONCENTRADOR (4%T, 2.7%C)
Solución de monómeros	6.7 ml	0.9 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	5 ml	-----
Tris 0.5 M pH 6.8	-----	1.7 ml
SDS 10%	0.2 ml	0.07 ml
Agua bidestilada	7.9 ml	4.1 ml
Persulfato de amonio 10%	200 μ L	35 μ L
TEMED	8 μ L	4 μ L

Las placas de vidrio se enjuagaron con agua destilada y se limpiaron con metanol, ya secas se colocaron en la base de la cámara de electroforesis y se sujetaron con las pinzas. Se adicionó lentamente la mezcla del gel separador, evitando la formación de burbujas. Cuando la mezcla gelificó, se adicionó el gel concentrador colocando posteriormente el peine. Una vez gelificada la mezcla, el peine se removió con cuidado. Las placas así preparadas se colocaron en la cámara, la cual se llenó con regulador de corrimiento. Se colocaron 200 μ l de cada muestra con 200 μ L del regulador de tratamiento de muestras y se calentaron a ebullición durante 1 min. Posteriormente se les adicionó 10 μ L de solución colorante de azul de bromofenol al 0.1%. Las muestras se colocaron con micropipeta, colocándose 40 μ L de cada muestra por duplicado y 15 μ L de los marcadores de peso molecular. El corrimiento del gel se realizó en una cámara de electroforesis vertical. Al inicio la corriente fue de 0.017 A, cuando las muestras entraron al gel separador la corriente se incrementó a 0.124 A, hasta terminar la corrida (aproximadamente 2 h). El corrimiento se detuvo cuando las muestras llegaron a medio centímetro del final de la placa. Posteriormente se procedió a la tinción del gel, utilizando azul de Coomassie como se describe a continuación: El gel se colocó en un recipiente con la cantidad suficiente de solución colorante de azul de Coomassie al 0.125% para cubrir toda su superficie durante 12 h aproximadamente. El colorante fue

removido y se adicionó solución decolorante I (metanol 50%, ácido acético 10%) durante 90 min, agitando un poco y haciendo los cambios necesarios de la solución para eliminar el colorante. Posteriormente se adicionó la solución decolorante II (ácido acético 7%, metanol 5%) dejándola el tiempo suficiente hasta poder observar las bandas. Finalmente, el gel se colocó en la solución conservadora (ácido acético 7%).

Después de la electroforesis a 0.124 A, por 2 h, se identificó la banda con actividad inhibitoria usando el método descrito por Bhunia (1988), que consistió en cortar verticalmente el gel después de la electroforesis, colocando solo una mitad en una placa de agar MRS conteniendo 10^6 UFC/ml de la cepa indicadora, que para este ensayo fue *Salmonella* Typhimurium. Se incubó a 37°C, 18 h y se identificó la zona de inhibición.

5.2.3. SEPARACIÓN DE LA PROTEÍNA TIPO BACTERIOCINA POR ADSORCIÓN-DESORCIÓN

También se semipurificó la bacteriocina producida por la cepa BAL 110 *Lb. plantarum*, mediante el método de adsorción-desorción celular propuesto por Yang y col. (1992). El método consiste en que, después de la producción de la bacteriocina en un medio líquido, éste se ajustó al valor de pH de máxima adsorción de la bacteriocina sobre la superficie de la célula blanco (pH 6.5). Posteriormente, la bacteriocina se separó de las células incubando al valor de pH de máxima desorción de la bacteriocina a la superficie de la célula (pH 2).

La cepa de *Lb. plantarum* se incubó durante 24 h/37°C en caldo MRS. El cultivo se ajustó a pH 6.5, que fue el valor de máxima adsorción, se calentó a 70°C por 5 min para destruir las células y se centrifugó 15000 rpm 15 min. Las células se lavaron con regulador de fosfatos 5 mM (fosfato de sodio pH 6.5) y se resuspendieron en 50 mL de solución de cloruro de sodio 100 mM pH 2, para separar la proteína tipo bacteriocina de las células. Se agitó durante 1 h/4°C. Se centrifugó el paquete celular 29000 rpm por 20 min y en el sobrenadante se obtuvo la proteína tipo bacteriocina parcialmente purificada,

el sobrenadante se dializó en membranas de diálisis de 1000 de valor de corte a 4°C durante 24 h. En el dializado se determinó concentración de proteínas y actividad inhibitoria.

En cada paso del proceso de purificación se determinó:

- título de actividad inhibitoria en unidades de actividad por mililitro (UA/mL)
- concentración de proteínas por el método de Bradford (1976) en mg/mL
- actividad específica expresada como el título de actividad inhibitoria en UA/mL dividido entre la concentración de proteínas en mg/mL

❖ Determinación de la concentración de proteínas, por el método de Bradford (1976). Se utiliza para la determinación de la concentración de la proteína en soluciones, el cual se basa en la saturación de la proteína al colorante Coomassie G-250 (Reactivo de Bradford). El colorante libre puede existir en cuatro diversas formas iónicas para las cuales los valores del pKa sean 1.15, 1.82, y 12.4. De las tres formas cargadas del colorante que predominan en la solución ácida del reactivo de análisis, las formas rojas tienen máximos de absorbancia en 470 nm y las verdes más catiónicas tienen máximos de la absorbancia en 650 nm. En contraste, la forma azul más aniónica del colorante, que ata a la proteína, tiene un máximo de la absorbancia en 590 nm., por lo cual la cantidad de proteína puede ser estimada determinando la cantidad de colorante en la forma iónica azul. Esto es generalmente midiendo la absorbancia de las muestras en 595 nm. Después se interpolan en una curva de calibración realizada previamente con Albúmina bovina serica (BSA) y se determina la concentración de proteína.

❖ Actividad inhibitoria: se probó la capacidad de la proteína tipo bacteriocina para inhibir a la cepa indicadora, ésta se determinó con la técnica de la doble capa descrita por Lewus y Montville (1991), método de botón en un medio sólido, observando la formación de halos de inhibición cuando la cepa de BAL produce compuestos que inhiben a la cepa de prueba.

Se obtuvo un cultivo puro de la cepa en caldo MRS a 30°C durante 18 h. Se colocó 10 mL del medio MRS (0.8% agar) sin glucosa, en una caja de Petri, se dejó secar y se colocaron porciones de 2 µL del cultivo de la cepa. Las placas se incubaron a 30°C durante 18 h. Posteriormente se colocaron 8 mL del mismo medio con 20 µL del microorganismo indicador (*S. Typhimurium* ATCC6539). Las cajas se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa indicadora durante 18 h. El efecto antibacteriano se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de botones. Tomando como positivas las zonas de inhibición mayores de 1 mm alrededor de los halos de inhibición.

El inóculo del microorganismo indicador (*S. Typhimurium* ATCC6539) se obtuvo a partir del crecimiento en agar soya tripticaseína el cual se pasó a un tubo con caldo soya tripticaseína que se incubó por 24 hrs a 37°C (Neria, 2006).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se seleccionó la cepa 110 *Lb. plantarum*, para los fines que se persiguen en este proyecto de realizar la etapa de purificación parcial de la bacteriocina. Con respecto a resultados de pruebas anteriores la cepa BAL 110 *Lb. plantarum* mostró actividad inhibitoria en agar MRS modificado contra los microorganismos de prueba (Neria, 2006), ya que inhibió a *S. typhimurium* y tubo mayor capacidad de inhibición frente a microorganismos que con mayor frecuencia contaminan los productos lácteos, en comparación con las otras cepas de estudio. Lo cual es interesante, puesto que *S. typhimurium* es una bacteria de particular interés en la salud pública, debido a que es un microorganismo patógeno de alto riesgo para el hombre y puede transmitirse a través del consumo alimentos contaminados generando diversos brotes y que tiene la capacidad de sobrevivir y desarrollarse a temperaturas de refrigeración (Fernández, 2000).

La purificación parcial de la proteína tipo bacteriocina contenida en 1 litro de caldo MRS se realizó comenzando con la precipitación con sulfato de amonio y diálisis subsecuente. Así también, se purificó parcialmente por el método de Yang y col. (1992). En general, los protocolos de laboratorio que han sido utilizados para la purificación total de las bacteriocinas, usualmente inician con una precipitación con sulfato de amonio seguido de una combinación de cromatografía por intercambio iónico, en algunos casos utilizan la ultrafiltración, y por último un paso final de HPLC (Carolissen-Mackay y col., 1997; Parente y Ricciardi, 1999). Por tanto, la metodología llevada a cabo en el presente trabajo fue establecida solo para purificar parcialmente la bacteriocina ya que no se realizó cromatografía y HPLC.

La determinación de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford debido a que es rápido y elimina muchos problemas que presentan otros métodos con el mismo fin. El método establecido por Bradford se basa en la reacción entre el colorante Azul de Coomassie G-250 y la proteína presente, ya

que el colorante al formar el complejo con la proteína cambia de color rojo a azul. La determinación de proteínas se realizó en dilución 1:100 debido a la alta concentración de proteínas presentes en los extractos.

Los resultados del proceso de purificación parcial se muestran en la tabla 6, comparando el extracto crudo con respecto al extracto parcialmente purificado y a la proteína tipo bacteriocina parcialmente purificada por el método de adsorción-desorción celular.

Tabla 7. Purificación de la proteína tipo bacteriocina producida por la cepa 110 *Lb. plantarum*

Paso de purificación	Título (UA/ml)	Proteínas (mg/ml)	Actividad específica (UA/mg de proteína)*
Extracto crudo	64	7.8	8
Extracto Parcialmente Purificado	128	1.34	95
Adsorción-desorción celular	128	0.87	147

$$*(UA/mg) = (UA/ml)/(mg/ml)$$

La actividad específica detectada en la proteína tipo bacteriocina parcialmente purificada por el método de adsorción-desorción es de 147 UA/mg de proteína. A partir del extracto crudo de un cultivo de 18 h y con base en la actividad específica detectada, la bacteriocina se concentró más veces por el método de adsorción-desorción. Estos valores determinan que mediante el método de adsorción-desorción celular se favorece la obtención de la proteína tipo bacteriocina lo cual representa una mejor alternativa a los métodos de purificación de bacteriocinas utilizados tradicionalmente.

El método de adsorción-desorción celular tiene como principio la afinidad de las bacteriocinas, por la pared celular de la cepa productora hacia receptores

específicos y la posterior liberación de los mismos, dependiendo de la variación del pH del medio (Yang y col., 1992). Este método, ya ha sido utilizado para la purificación de bacteriocinas (Jiménez y col., 2001). Al evaluar la actividad antimicrobiana de la bacteriocina producida por *L. acidophilus*, se determinó que los valores de pH ácidos (2-6) favorecieron la adsorción de la bacteriocina a las células productoras en un 60%, en los valores de pH básicos (7-9) se estimó una adsorción del 100% y a pH 10 se adsorbió el 90% de la bacteriocina a las células productoras.

Una metodología similar a la que se describe en este trabajo fue aplicada por Ji-Woon y col. (2000), al estudiar la bacteriocina lacticina BH5 producida por *Lactococcus lactis* BH5; para su purificación parcial primero centrifugaron el medio de cultivo, separando el sobrenadante el cual fue esterilizado por filtración. Añadieron sulfato de amonio lentamente a una temperatura de 4°C agitando por 5 horas, las proteínas precipitadas fueron separadas por centrifugación a 12,000 g durante 20 min a 4°C, resuspendidas y dializadas contra 2 L de regulador de fosfatos 0.1 M, recuperando el 97.6% de la actividad de la bacteriocina purificada.

También se probó la capacidad de la proteína tipo bacteriocina para inhibir a la cepa *S. typhimurium*, ésta se determinó con la técnica de la doble capa descrita por Lewus y Montville (1991), observando la formación de halos de inhibición cuando la cepa de BAL produce compuestos que inhiben a la cepa de prueba (figura 2).

Se eliminó la glucosa de la fórmula del caldo y agar MRS para evitar la producción de ácido láctico, el cual tiene amplio espectro de inhibición cuando se encuentra sin disociar; sin embargo, la eliminación de este metabolito no impide la formación de otros compuestos inhibitorios. Por lo tanto, puede suponerse que la inhibición de las BAL no se debió a producción del ácido láctico sino a la acción de una bacteriocina u otro metabolito (González y col., 2003).

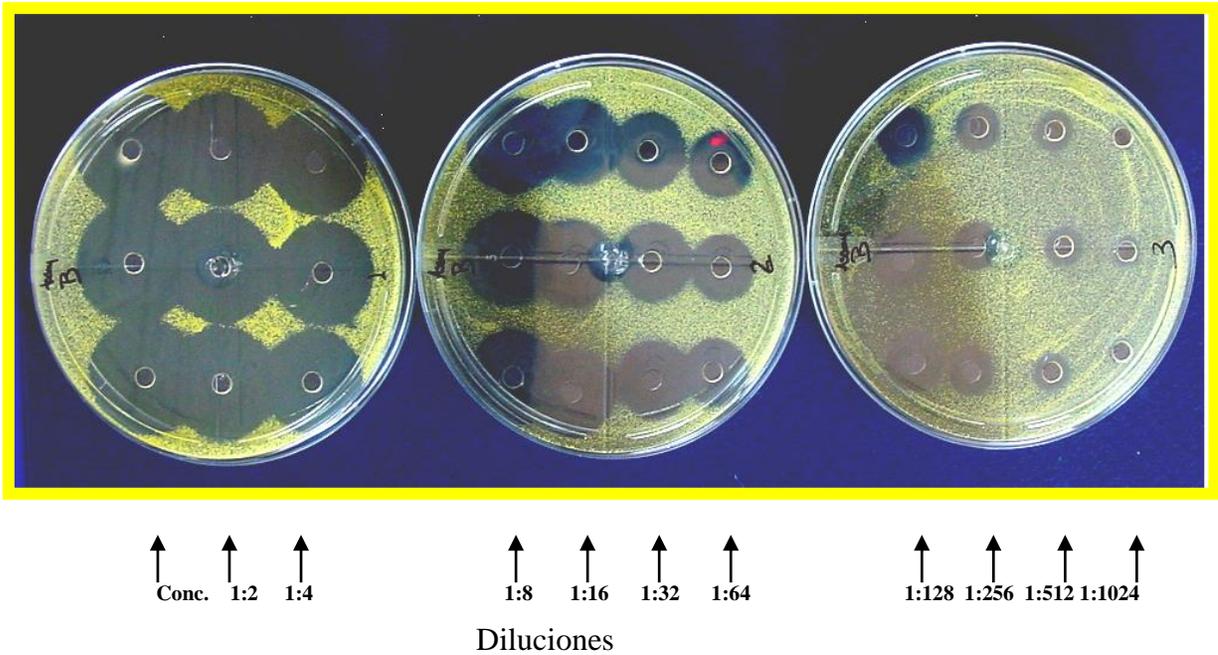


Figura 2. Sensibilidad de *S. typhimurium* a la proteína tipo bacteriocina producida por la cepa 110 *Lb. plantarum* en medio MRS sin glucosa.

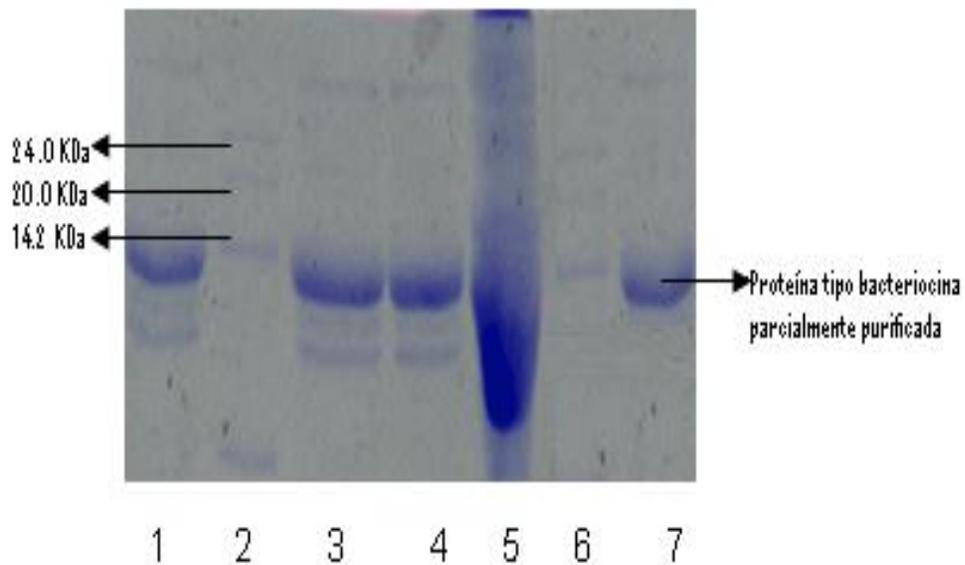
La electroforesis se llevó a cabo en geles de PAGE-SDS al 10% con el extracto crudo, el extracto parcialmente purificado y con replicas de la proteína tipo bacteriocina parcialmente purificada por el método de adsorción-desorción celular. Mediante el uso de marcadores de peso molecular se pudo determinar el peso molecular aproximado de la proteína tipo bacteriocina obtenida, comparando las bandas obtenidas de los extractos contra las bandas de cada marcador que fueron: tripsinógeno (24,000 Da), inhibidor de tripsina (20,000 Da) y lactalbúmina (14,200 Da).

Si el SDS no fuera utilizado en la separación, las proteínas con los pesos moleculares similares emigrarían de forma diferente en el gel debido a las diferencias en su masa, pues las proteínas se separan usando la corriente eléctrica y por talla de la matriz del gel, las diferencias en cargas (además de masa) desempeñarían un papel en la separación.

En el gel obtenido una vez realizada la PAGE-SDS de los extractos y de la proteína tipo bacteriocina parcialmente purificada, se detectarón bandas de

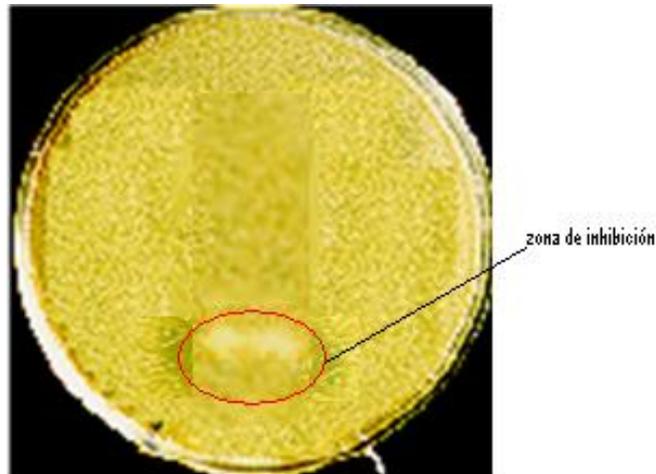
peso molecular de aproximadamente 12,000 Da (Figura 3). De la cual se probó su actividad inhibitoria (Figura 4).

Figura 3. Electroforesis en gel de PAGE-SDS



- 1** Extracto parcialmente purificado
- 2** Marcadores de Peso Molecular: tripsinógeno 24 K Da, inhibidor de tripsina 20 KDa y lactoalbúmina 14.2 KDa.
- 3** Proteína tipo Bacteriocina Parcialmente Purificada (PBPP por adsorción-desorción)
- 4** PBPP por adsorción-desorción
- 5** Extracto crudo
- 6** Marcadores de Peso Molecular: tripsinógeno 24 K Da, inhibidor de tripsina 20,000 KDa y lactoalbúmina 14.2 KDa.
- 7** PBPP por adsorción-desorción

Figura 4. Detección de Actividad inhibitoria en el gel



Gel recubierto con agar MRS conteniendo *S. Typhimurium*

Diversos investigadores han empleado la electroforesis para determinar el peso molecular de las bacteriocinas que purifican. En un estudio realizado por Ji-Woon y col. (2000) estimaron el peso molecular de la bacteriocina lacticina BH5, mediante electroforesis en PAGE-SDS al 16%, utilizando 20 μ l de muestra y de cada uno de los estándares de peso molecular como ovoalbúmina, lactoglobulina, lisozima e insulina, con un tratamiento térmico previo de la muestra. Al final del corrimiento electroforético, el gel fue teñido con azul de Coomassie, obteniendo como resultado un peso molecular aproximado de 3000 a 3500 Da. De acuerdo a la literatura diversos investigadores han demostrado que no todas las bacteriocinas se pueden teñir con el colorante azul de Coomassie ya que no observaron la presencia de bandas al realizar la tinción, sin embargo al ser teñidas con nitrato de plata si se pudieron observar (Hoover y Harlander, 1993).

Al purificar y caracterizar bacteriocinas aisladas de una cepa de *Enterococcus* a partir de leche fermentada (Batdori y col., 2006), se identificó que la bacteriocina enterocina A5-11, fue estable al calor y no sensible a las condiciones de pH 2-10, pero sensible a varias enzimas proteolíticas. Su

actividad inhibitoria fue eliminada completamente después del tratamiento con proteinasa K y alfa-quimotripsina. La actividad sin embargo no fue completamente desactivada por otras proteasas incluyendo tripsina y pepsina. Los análisis SDS-PAGE revelaron que la enterocina A5-11 tiene una masa molecular de 5000 Da y los análisis de espectrometría de masas demuestran masas moleculares de 5206 y 5218 Da para las fracciones A5-11A y A5-11B, respectivamente. El análisis de aminoácidos de ambas enterocinas indicaron diferencia cuantitativa significativa en su contenido en treonina, alanina, isoleucina y leucina. Concluyendo dicha investigación las bacteriocinas A5-11A y A5-11B de *Enterococcus* pertenecen a la clase II de bacteriocinas y muestran alto grado de similitud con enterocinas L50A y L50B aisladas de *Enterococcus faecium* (Cintas y col., 2001) y con la enterocina producida por *E. faecium* JCM 5804T que inhibe el crecimiento de *Lactobacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Listeria monocytogenes* y es resistente a vancomicina (Park y col. 2003). Sin embargo, no fue efectiva contra cepas Gram negativas, *Weisella spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Lactococcus spp.* o *S. aureus* resistente a la meticilina. La actividad inhibitoria de *E. faecium* JCM 5804T fue desactivada por proteinasa K, tripsina, alfa-quimotripsina y papaína, pero no por la lisozima, lipasa, catalasa o beta-glucosidasa. La actividad inhibitoria era estable a 100°C durante 30 minutos y tenía un rango de pH de 2 a 10. El peso molecular de la bacteriocina parcialmente purificada fue 4500 Da. La reacción en cadena de la polimerasa y métodos de secuenciación directa identificaron tres tipos diferentes de bacteriocinas producidos por *E. faecium* JCM 5804T, enterocina A, B y P.

La realización de estos ensayos demostrarán que el compuesto inhibitorio, probablemente la bacteriocina, se encuentra presente no solo en el extracto crudo, sino en el extracto parcialmente purificado. Así se demuestra que con la metodología descrita en este trabajo, el compuesto con actividad inhibitoria se ha recuperado después de la precipitación con sulfato de amonio y diálisis; sin embargo esta investigación y demás realizadas aparte de las mencionadas anteriormente dan pauta para hacer uso de otros métodos que ayuden a caracterizar bacteriocinas de BAL e identificarlas completamente.

VII. CONCLUSIONES

- Se logró la purificación parcial de una proteína tipo bacteriocina que mostró actividad inhibitoria.
- Se caracterizó parcialmente una proteína tipo bacteriocina producida por *Lactobacillus plantarum*.
- En función de los resultados obtenidos hasta el presente, podemos inferir que el compuesto responsable de la inhibición de la cepa de prueba, es una proteína tipo bacteriocina; sin embargo, se requiere realizar pruebas adicionales para demostrar su identificación bioquímica completa.

VIII. ANEXOS

- Solución colorante azul de Bromofenol 0.1%

Fórmula	Cantidad
Azul brillante de Bromofenol	100 mg
Etanol 95 %	50 ml
Ácido fosfórico al 85%	100 ml
Agua destilada	Aforar a 1 L

- Soluciones PAGE-SDS (Gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio)

Solución de monómeros (30% T 2.7 C_{bis})

Fórmula	Cantidad
Acrilamida	24.2 g
Bisacrilamida	0.8 g
Agua destilada	100 ml

Regulador de gel separador (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8)

Fórmula	Cantidad
Tris	36.3 g
Agua bidestilada	200 ml
HCl	Ajustar pH a 8.8

Regulador del gel concentrador (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8)

Fórmula	Cantidad
Tris	3 g
Agua bidestilada	50 ml
HCl	Ajustar pH a 6.8

Regulador de lavado (Tris-HCl 0.375 M pH 8.8, SDS 0.1%)

Fórmula	Cantidad
Tris	12.5 ml de la solución 2
SDS	0.5 ml de la solución 4
Agua bidestilada	Aforar a 50 ml

Regulador del tratamiento de muestras 2x(Tris-HCl 0.125 M pH 6.8, SDS 4%, glicerol 20%, 2-mercaptoetanol al 10%)

Fórmula	Cantidad
Tris	2.5 ml de la solución 3
SDS	4 ml de la solución 4
Glicerol	2 ml
2-mercaptoetanol	1 ml
Agua bidestilada	Aforar a 10 ml

Regulador de corrimiento (Tris-0.025 M pH 8.3, Glicina 0.192 M, SDS 0.1%)

Fórmula	Cantidad
Tris	12 g
SDS	40 ml de la solución 4
Glicina	57.6 g
Agua bidestilada	Aforar a 4 L

- Solución colorante Azul de Coomassie R-250

Solución madre (azul de Coomassie al 1%)

Solución colorante para tinción (Azul de Coomassie 0.125%, metanol 50%, ácido acético 10%)

Fórmula	Cantidad
Azul de Coomassie	62.5 ml de solución 1
Metanol	250 ml
Ácido Acético	50 ml
Agua bidestilada	Aforar a 500 ml

Solución decolorante I (metanol 50%, ácido acético 10%)

Fórmula	Cantidad
Metanol	500 ml
Ácido acético	100 ml
Agua bidestilada	Aforar a 1 L

Solución decolorante II (ácido acético 7%, metanol 5%)

Fórmula	Cantidad
Metanol	100 ml
Ácido acético	140 ml
Agua bidestilada	Aforar a 2 L

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, M.R. y Moss, M.O. 1997. Agentes bacterianos de enfermedad transmitida por los alimentos. Microbiología de los alimentos. (Eds). Acribia, S.A. Zaragoza. España.
2. Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and Physiology. En: Lactic acid bacteria. Microbiological and functional aspects. Salminen, S., von Wright, A. y Ouwehand, A. (Eds.). Marcel Dekker, Inc., New York, EE UU.
3. Bascomb, S. y Manafi, M. 1998. Use of enzyme test in characterization an identification of aerobic and facultatively anaerobic Gram-positive cocci. Am. Soc. Microbiol. 11(2):318-340
4. Batdori B, Dalgalarrrondo M, Choiset Y, Pedroche J, Métro F, Prévost H, Chobert JM y Haertlé T. 2006. Purification and characterization of two bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Mongolian airag. J. Appl. Microbiol. 101(4):837-48
5. Bhunia, A.K., M.C. Johnson y B. Ray. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilacti*. J. Appl. Bacteriol. 65:261-268.
6. Bizani, D., Motta, A., Morrissy, Terra, R., Souto, A y Brandelli, A. 2005. Antibacterial activity of cerein 8A, a bacteriocin-like peptide produced by *Bacillus cereus*. Int. Microbiol. 8:125-131.
7. Björkroth, J., Schillinger, U., Geisen, R., Weiss, N., Hoste, B., Holzappel, w. H., Korkealy H. J., y Vandamme, P. 2002. Taxonomic study of *Weissella confusa* and description of *Weissella cibaria* spp., detected in food and clinical samples. Int. J. Syst. Bacteriol. 52: 141-148.
8. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.
9. Carolissen-Mackay, V., G. Arendse y J.W. Hastings. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. Int. J. Food Microbiol. 34:1-16.
10. Cintas, L.M., Casaus, M.P., Herranz, C., Nes, I.F. y Hernández, P.E. 2001. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Food Science Technol. Inter. 7(4): 281-305.
11. Clavel, M. M., 2006. Condiciones microbiológicas y aislamiento de bacterias lácticas en quesos artesanales del Estado de Hidalgo. Tesis de licenciatura. UAEH, México.
12. Deegan LH. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. D. J.; 16 (9): 1058-1071.
13. Delves-Broughton, J. 1991. Nisin and its use as a food preservative. Food Technol. 44:110-117.

14. Elegado, F., Guerra, M., Macayam, R., Mendoza, H y Lirazan, M. 2005. Spectrum of bacteriocina activity of *Lactobacillus plantarum* BS and fingerprinting by RAPD- PCR. Int. J. Food Microbiol. 95: 11-18.
15. Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K y Ishizaki A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. Microbiol. Rev. 24(1):85-106.
16. Farnworth ER. 2001. Probiotics and prebiotics. En Handbook of Nutraceutical and functional foods (RE Wildman) Eds. CRC Press. Cap. 25: 407 - 422.
17. Facklam, R. y Elliott, J.A. 1995. Identification, classification and clinical relevance of catalase negative, Gram-positive cocci, excluding the streptococci and Enterococci. Am. Soc. Microbiol. 8(4):479-495.
18. Ferchichi M, Frère J, Mabrouk K, Manai M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMFII, isolated from a Tunisian dairy product. Microbiol. Lett. 205(1):49-55.
19. Fernández, E. E. 2000. Microbiología e Inocuidad de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro. México.
20. Fimland, G., Blingsmo, O., Sletten, K., Jung, G., Nes, I y Nisen-Meyer, J. 1996. New Biologically Active Bacteriocins Constructed by Combinig Regions from Various Pediocin-Like Bacteriocins: the C-Terminal Region in Important for Determining Specificity. Appl. Environ. Microbiol. 62(9): 3313- 3318.
21. Fuller, R. 1992. Probiotics. The scientific basis. Historiy and development of probiotics. (Eds). Chapman y Hall.
22. González. V. R. Ruiz, G. O., García I. E. y Vega, G. M., 2005. Aplicaciones de la biotecnología en seguridad alimentaria. Agencia Española de seguridad Alimentaria/Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica.
23. González-Martínez, B. I., Gómez-Treviño, M. y Jiménez-Salas, Z. 2003. Bacteriocinas de probióticos. RESPYN 4(2): 99-106.
24. Grande, M.J., Lucas, R., Abriouel, H., Valdivia, E., Omar, N. Ben., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. y Martínez-Cañamero, A. 2006. Inhibition of Toxicogenic *Bacillus cereus* in rice-based foods by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. 106: 185-194.
25. Grande, M., Lucas, R., Abriouel, H., Ben-Omar, N., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M., Martínez-Cañamero, M., Valdivia, E & Galvez, 2005. Control of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in fruit juices by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. 104: 289-297.
26. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoesktra H. 2000. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. J Ped. Gast. Nutr. 30 (1): 54-60.
27. Gutierrez M. V., 2005. Caracterización inmonoquímica de la Enterocina P. y evaluación de su clonación, producción y expresión funcional en *Escherichia coli*, *Methylobacterium extorquens* *Lactococcus lactis* y *Pichia pastoris*. Tesis doctoral, U. Complutense de Madrid, España.

28. Hoover, D. G. y S.K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. (Eds) Academic Press, Inc., London. pp. 23-39.
29. Hoover, G.D. y R.L. Steenson. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Academic Press. E.U.A.
30. Jay, M. J. 2000. Microbiología Moderna de los Alimentos. 4ª edición. Ed. Acribia. España.
31. Jiménez-Hernández M., Escudero-Abarca B. y Mendoza G. P. 2001. Purificación de la bacteriocina producida por *Lactobacillus acidophilus* 11088 (NCK 88) (*L. johnsonii* 11088) por Adsorción Celular. Food Technol. 148-155.
32. Jiménez-Díaz R, Ríos-Sánchez RM, Desmazeaud M, Ruiz-Barba JL y Piard JC. Plantaricins S and T. 1993. Two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59 (5): 1416-1422.
33. Ji-Woon, H., H.H. Hyun, Y.R. Pyun, T.S. Kim, I.H. Yeo y H.D. Paik. 2000. Identification and partial characterization of Lacticin BH5, a Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* BH5 isolated from kimchi. J. Food Prot. 63(12):1707-1712.
34. Joerger, R. 2002. Alternatives to Antibiotics: Bacteriocins, Antimicrobial Peptides and Bacteriophages. Poultry Science. 82: 640-647. Food Microbiol. 91: 91-98.
35. Juneja, K.V. y Sofos N.J. 2002. Control of microorganisms with chemicals: En Control of foodborne microorganisms. (Eds) Marcel Dekker. pp. 166-172.
36. Kalchayanand, N., Dunne, P., Sikes, A y Ray, B. 2004. Viability loss and morphology change of foodborne pathogens following exposure to hydrostatic pressures in the presence and absence of bacteriocins. Int. J. Microbiol. 70:337-349
37. Kato T, Matsuda T, Ogawa E, Ogawa H, Kato H, Doi U. 1994. Plantaricin-149, a bacteriocin produced by plantaricin NRIC 149. J. F. Bioeng. 77 (3): 277-282.
38. Kong, S. y Davison, A. J., 1980. The role of interactions between O₂, H₂, OH⁻, e⁻ and O₂⁻ in free radical damage to biological systems. Arch. Biochem. Biophys. 204:13-29.
39. Krier, F. y A.M. Revol-Junelles. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50:359-363.
40. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nat. 227:680-685.
41. Leveau, J. Y. y Bouix, M., 2000. Microbiología Industrial. Los microorganismos de interés industrial. Ed. Acribia, España.
42. Lewus CB, Kaiser A, Montville TJ. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57 (6): 1683-1688

43. Lewus, C. B. y T.J. Montville. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbiol. Methods*. 13:145-150.
44. Moll GN, Konings WN, Driessen AJ. 1999. Bacteriocins: mechanism of membrane insertion and pore formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 76(1-4):185-98.
45. Morais, F., Juárez, M. y Olano A. 2004., Grupo de coordinación. Alimentos funcionales. Fundación Española para la Ciencia y la Tecnología. Madrid.
46. Narváez, P., Pedroza, R. Alonso, G. y Rodríguez L. V. 2005. Caracterización de plásmidos de resistencia a antibióticos en aislados nosocomiales del Hospital Universitario de Caracas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol*. 25(1):29-34
47. Neria, P. 2006. Evaluación de la capacidad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas aisladas de productos lácteos. Tesis de licenciatura. UAEH. México.
48. Nettles, C.G., y S.F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Prot*. 56(4):338-356.
49. Ogunbanwo, S., Sanni, A y Onilude, A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *Afr. J. Biotechnol*. 2(7): 179-184.
50. Ortiz, B. 2006. Identificación bioquímica de bacterias ácido lácticas a partir de productos lácteos en el estado de Hidalgo. UAEH. México.
51. Ouwehand, A. C., 1998. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. En: *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, 2ª edición. Salminen, S. y von Wright, A. Eds. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
52. Pal, V., Jamuna, M y Jeevaratnam, K. 2005. Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from a south indian special dosa (appam) batter. *J. Cult. Collect*. 4:53-60
53. Parente E. y A. Ricciardi. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 52: 628-638.
54. Park SH, Itoh K, Fujisawa T. 2003. Characteristics and identification of enterocins produced by *Enterococcus faecium* JCM 5804T. *J. Appl. Microbiol*. 95(2):294-300
55. Pereda, A.A. A.L.S. Vega y L. Mota de la Garza. 1990. Identificación de bacterias Lácticas de interés industrial mediante micrométodos. *Rev. Lat-amer. Microbiol*. 32:24-29.
56. Piard, J. C. y Desmazeuau M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait* 71:525-541.
57. Podolak PK, Zayas JF, Kastner CL y Fung DYC. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 on beef by application of organic acids. *J Food Prot*. 59 (4): 370-373.
58. Rachman, C., Kabadjova, P., Valcheva, R. Hervé Prévost, H. y Dousser, X. 2004. Identify of Carcinobacterium species by restriction fragment

- length polymorphism of the 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region and species-specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(8):4468-4477.
59. Ray, B., Daeschel, M. 1992. Food biopreservatives of microbial origin. CRC press. Florida. pp. 57-63, 177-199.
60. Rodgers, S. 2001. Preserving non-fermented refrigerated foods with microbia cultures – a review. *T. Food Sc. Technol.* 12: 276-284
61. Rodríguez, J.M., M.I. Martínez, N. Horn y H.M. Dodd. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 80(2):101-116.
62. Schrezenmeir J. de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics and symbiotics: approaching a definition. *Am. J. Clinical Nutr.* 73 (2): 361-364.
63. Simpson, P. J., Stanton, C., Fitzgerald G. F. y Roos R. P. 2001. Genomic diversity within the genus *Pediococcus* as revealed by randomly amplified polymorphic DNA and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(2):765-771.
64. Stiles ME y Holzapfel WH. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Int. J. Food Microbiol.* 36 (1): 1–29.
65. Stoffels, G., H.G. Sahl y A. Gudmundsdottir. 1993. Carnocin IU49, a potential biopreservative produced by *Carnobacterium piscicola*: large scale purification and activity against various Gram positive bacteria including *Listeria sp.* *Int. J. Food. Microbiol.* 20:199-210.
66. Svetoslav, T., Vaz-Velho, M y Gibbs, P. 2004. Comparison of two methods for purification of plantaricin ST31, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST31. *Braz. J. Microbil.* 35: 157-160.
67. Toba T, Kotani T y Adachi S. 1991. Capsular polysaccharide of a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk 'långfil'. *J. Food Microbiol.* 12(2-3):167-71.
68. Turgay, E.O., Cetil O. y Ergün O. 2002. A study on metabolic and antimicrobial activities of *Pediococcus pentosaceus* isolated from fermented sausage. *Pak. J. Biol. Sc.* 5 (5), 594-596.
69. Villegas de Gante A. 2004. Los quesos mexicanos de pasta texturizada. CARNILAC Industrial. Vol. 19, No. 2. México.
70. Wagner, N., Tran, Q. H., Selzer, P. M. y Uden, G. 2005. Pyruvate fermentation by *Genococcus oeni* and *Leuconostoc mesenteroides* and role pyruvate dehydrogenase in anaerobic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (9):4966-4971.
71. Wood, B. J. B. y Holzapfel, W. H., 1995. The Lactic Acid Bacteria, vol. 2 The Genera of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic Professional, UK.
72. Yang, R., Johnson, M. C. y Ray B. 1992. A novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58:3355-3359.
73. Zúñiga Estrada, A. 2000. Los probióticos: Bases para su utilización en el hombre y los animales. Tesis doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN. México.