



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Identificación y caracterización de la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos sintetizados durante la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*”

TESIS DE POSGRADO

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

PRESENTA

I.B.Q. RAFAEL MADRIGAL CHÁVEZ

DIRIGIDO POR

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

CODIRIGIDO POR

DR. JUAN CARLOS GONZÁLEZ HERNÁNDEZ

CENTRO UNIVERSITARIO, QUERÉTARO, QRO.

NOVIEMBRE DE 2023



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales
de Información



Identificación y caracterización de la actividad
biológica de los péptidos antimicrobianos sintetizados
durante la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*

por

Rafael Madrigal Chavez

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Clave RI: FQMAC-309119



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
Facultad de Química



Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Tesis

“Identificación y caracterización de la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos sintetizados durante la fermentación sumergida de *Bacillus subtilis*”

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencia y Tecnología de alimentos

Presenta

I.B.Q. Rafael Madrigal Chávez

Dirigido por

Dr. Carlos Regalado González

Co-dirigido por

Dr. Juan Carlos González Hernández

Dr. Carlos Regalado González

Director

Dr. Juan Carlos González Hernández

Codirector

Dr. Aldo Amaro Reyes

Vocal

Dra. Sofía María Arvizu Medrano

Vocal

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano

Suplente

Dra. Silvia Lorena Amaya Llano
Directora de la Facultad de Química

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.

Noviembre de 2023

DEDICATORIA

Dedicado con amor y gratitud a la memoria de mi querido abuelito Marcelino Madrigal Pérez, cuya luz y sabiduría continúan guiándome desde lo más profundo de mi corazón. Tu sabiduría y amor han dejado una huella imborrable en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi profundo agradecimiento por el invaluable apoyo social y académico brindado por mis distinguidos asesores, el Dr. Carlos Regalado González y el Dr. Juan Carlos González Hernández. Su compromiso con mi desarrollo académico, profesional y personal ha sido fundamental en esta travesía.

Agradezco de igual manera a mis respetados profesores: el Dr. Aldo Amaro Reyes, la Dra. Sofía María Arvizu Medrano y la Dra. Silvia Lorena Amaya Llano. Sus sabios consejos y su presencia constante en cada etapa de mi proyecto, ofreciéndome valiosas propuestas y recomendaciones para su mejora, han sido invaluable.

No puedo pasar por alto la generosa apertura de la Universidad Autónoma de Querétaro a la que le agradezco por brindarme acceso a su vasto conocimiento. Especial reconocimiento al Laboratorio de Biotecnología, dirigido por el Dr. Carlos Regalado González y la Dra. Blanca Estela García Almendarez. Más que meros educadores, han sido pilares en mi camino, facilitándome las herramientas, los recursos y el apoyo académico necesarios para llevar a cabo mi investigación.

A mis compañeros de laboratorio y amigos de generación, Raquel Ramírez, Javier Ramírez, Héctor Hernández y Lizbeth Bravo, agradezco los días de trabajo ameno y divertido compartidos en el laboratorio. De manera especial, mi gratitud se dirige hacia mi amiga y compañera, Alejandra de la Garza, cuyo apoyo académico y emocional a lo largo de toda la maestría ha sido inestimable.

A mis queridos padres y hermanos, les agradezco de corazón por su apoyo constante a lo largo de mi carrera. En particular, a mi padre, cuyos consejos han sido faros orientadores en mi crecimiento como profesional y ser humano.

Por último, quiero reconocer y agradecer el apoyo financiero proporcionado por CONAHCYT, cuya contribución ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto.

Mi tesis no habría sido posible sin la generosidad, la orientación y el apoyo de todas estas personas e instituciones. Estoy eternamente agradecido por su inestimable ayuda en esta travesía académica y personal.

ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>B. subtilis</i>	2
2.1.1. Crecimiento y desarrollo de <i>B. subtilis</i>	2
2.1.2. Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i>	4
2.2. Compuestos antimicrobianos producidos por <i>B. subtilis</i>	5
2.2.1. Lipopéptidos	6
2.2.2. Sideróforos	9
2.2.3. Enzimas.....	9
2.2.4. Bacteriocinas	11
2.3. Aplicaciones de las bacteriocinas.....	18
2.3.2. Criterios de selección y seguridad de las bacteriocinas para ser utilizadas en la conservación de alimentos	19
2.4. Fermentación sumergida.....	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. OBJETIVOS	23
4.1. Objetivo general	23
4.2. Objetivos particulares	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
5.1. Material biológico	24
5.2. Reactivos, medios de cultivo y geles para electroforesis	24
5.3. Diseño experimental.....	25

5.4.	Diagrama general de la metodología	25
5.5.	Métodos.....	25
5.5.1.	Conservación de la cepa de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 mediante crioconservación	25
5.5.2.	Cinéticas preliminares en matraz de 250 mL.....	26
5.5.3.	Cinéticas de crecimiento de los tratamientos del diseño experimental..	27
5.5.4.	Escalamiento a nivel biorreactor.....	27
5.5.5.	Cuantificación de biomasa.....	28
5.5.7.	Concentración de los extractos libre de células.....	29
5.5.8.	Tinción de endosporas con verde de malaquita	29
5.5.9.	Determinación de la actividad antimicrobiana	30
5.5.10.	Determinación de la concentración de proteína soluble de los extractos por el método de Bradford.....	30
5.5.11.	Extracción de ADN, evaluación de la calidad e integridad de la extracción	31
5.5.12.	Amplificación del gen estructural <i>SpaS</i> de la subtilina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	32
5.5.13.	Efecto del extracto concentrado sobre de <i>S. aureus</i> en lomo de cerdo.	33
5.6.	Análisis estadístico.....	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1.	Cinéticas de crecimiento preliminares para evaluar el crecimiento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	34
6.2.	Efecto de la concentración de extracto de levadura y la concentración de la relación $MgSO_4/MnSO_4$ sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633	36
6.3.	Análisis de varianza del diseño experimental 3^2 para densidad óptica	44
6.4.	Análisis estadístico del diseño de experimentos para actividad antimicrobiana	47

6.5.	Evaluación del espectro antimicrobiano del extracto de péptidos producido por <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.....	50
6.6.	Escalamiento a nivel biorreactor del tratamiento con mayor actividad antimicrobiana	52
6.7.	Determinación de la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford.....	54
6.8.	Reto de <i>Staphylococcus aureus</i> en una matriz alimentaria tratada con los péptidos antimicrobianos obtenidos en la fermentación	56
6.9.	Identificación del gen estructural <i>SpaS</i> de la subtilina	60
7.	CONCLUSIONES	64
8.	REFERENCIAS	65
	ANEXOS	75
A.	Preparación de medios de cultivo, reactivos y soluciones.....	75
B.	Crecimiento como densidad óptica y actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 en los distintos medios de cultivo durante 72 h. .	76
C.	Actividad antimicrobiana de la evaluación de caldos de cultivo preliminares, Control (C), Soya tripticaseína (ST), Schaeffer modificado (SM), Nutritivo (N) y Luria Bertani (LB) a 12, 24, 48 y 72 h.	76
D.	Crecimiento como densidad óptica, actividad antimicrobiana, expresada en mm de diámetro de inhibición y en UI/mL y esporulación de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos.....	77
E.	Actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos.	80
F.	Espectro antimicrobiano de los péptidos sintetizados por <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 a la hora 48 del tratamiento 9 del diseño de experimentos.	82
G.	Parámetros de pH, temperatura, DO y rpm en biorreactor instrumentado de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 durante 48 h.....	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Características morfológicas de <i>Bacillus</i> spp. TE3 perteneciente a la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativo (www.itson.edu.mx/COLMENA). A) Células bacilares, Gram positivas; B) endosporas (flecha blanca) y células bacilares (flecha negra); y C) morfología macroscópica de la cepa TE3.	3
2	Ciclo de reproducción del género <i>Bacillus</i> . A) Ciclo vegetativo, B) esporulación.	4
3	Cinética de crecimiento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.	5
4	Compuestos antimicrobianos producidos por <i>B. subtilis</i> .	6
5	Mecanismo de interacción y disrupción de membrana de surfactina, iturina-A y fengicina, los cLPs bacterianos mejor estudiados.	8
6	Estructura de AHLs y sus correspondientes degradaciones enzimáticas por QQ. Las líneas discontinuas muestran los sitios de escisión de cuatro enzimas: (1) lactonasa; (2) descarboxilasa; (3) acilasa; (4) desaminasa.	10
7	Esquema de lisis de la pared celular de hongos fitopatógenos por acción de las enzimas líticas.	12
8	Clasificación general de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas.	13
9	Aminoácidos inusuales (A) lantionina, (B) deshidroalanina (Dha), (C) β -metillantionina, (D) labionina (Lab), (E) ácido aminobutírico (Abu) y (F) dehidrobutirina (Dhb).	12

10	Vía general de la biosíntesis de lantioninas.	13
11	Organización genética del grupo de genes de subtilina.	14
12	Representación esquemática de la biosíntesis de subtilina, transducción de señales y regulación en <i>B. subtilis</i> .	15
13	Actividad antimicrobiana de la subtilina.	17
14	Biorreactor de tanque agitado.	21
15	Densidad óptica a 600 nm (Barras) y la actividad antimicrobiana (Líneas) de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 en caldo nutritivo (A) Luria Bertani (B), Schaeffer modificado (C) y soya tripticaseína (D).	35
16	Densidad óptica a 600 nm de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos. D1-D9: tratamientos del diseño experimental (Tabla 1). Extracto de levadura: 0.0%; 0.5 %; 1.0 %.	38
17	Crecimiento de los tratamientos D2 y D4 ajustados al modelo de Gompertz. Siendo y = Población, a = Capacidad de carga, x = Punto en el tiempo en el que el crecimiento alcanza su máximo, x_c = desplazamiento en el eje X y k = tasa de crecimiento.	40
18	Tinción de esporas con el método de verde de malaquita. Presencia de esporas (A) y células vegetativas (B). Fotografías representativas de las tinciones de los tratamientos del diseño experimental.	41
19	Actividad antimicrobiana a las 48 h de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento, de acuerdo con el diseño de experimentos.	42

20	Diagrama de Pareto para densidad óptica. Azul, significativo con $p < 0.05$ y Gris, no significativo.	46
21	Efectos principales de los factores extracto de levadura 0.0, 0.5 y 1.0 % p/v, la concentración de la relación de $MgSO_4/MnSO_4$ de 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L sobre la densidad óptica a 600 nm de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.	47
22	Diagrama de Pareto para actividad antimicrobiana. Azul, significativo con $p < 0.05$ y Gris, no significativo.	49
23	Efectos principales de los factores extracto de levadura 0.0, 0.5 y 1.0 % p/v, la concentración de la relación de $MgSO_4/MnSO_4$ de 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L como respuesta la actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 ante <i>M. luteus</i> .	49
24	Esquema de pre-purificación y amplificación de ADN del cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.	50
25	Biorreactor instrumentado Applikon ez-control, modelo Z31011001.	52
26	Cinética de crecimiento en biorreactor de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633, y pH, la temperatura, oxígeno disuelto y la agitación que prevaleció en la cinética.	53
27	Población de <i>S. aureus</i> 8855 en diferentes concentraciones 0.0, 0.5, 2.0, 10.0 y 20.0 % (v/v) del extracto con actividad específica de 106.07 mm/g de proteína, evaluada durante 24 h a 37 °C en caldo soya tripticaseína.	56
28	Muestras de lomo de cerdo con <i>S. aureus</i> 8855 tratadas con el extracto E-M.	58

29	Curva de crecimiento de <i>S. aureus</i> 8855, evaluada durante 10 días. (●): en lomo de cerdo. (▲): en el mismo alimento, adicionando 0.2 mL del extracto concentrado (106.07 mg de inhibición/g de proteína).	58
30	Esquema de extracción y purificación de ADN obtenido de un cultivo de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633.	61
31	Electroforesis de la amplificación del gen estructural de la subtilina <i>SpaS</i> , carriles 1 y 6: marcadores de pares de bases (Bio-Rad, 1 kb), carriles 2-4 gen amplificado y carril 5 blanco son enzima Taq polimerasa.	62
32	Alineación de bacteriocinas de clase I publicadas de <i>Bacillus</i> spp. Las alineaciones se obtuvieron con SnapGene V4.2.6 con la configuración predeterminada.	63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tratamientos del diseño factorial 3 ² para evaluar las etapas de crecimiento y actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 variando la concentración de extracto de levadura y MgSO ₄ / MnSO ₄ .	37
2	Parámetros cinéticos de desarrollo de <i>B. subtilis</i> en los tratamientos del diseño experimental y estimados apartir del Modelo de Gompertz.	40
3	Actividad antimicrobiana a las 48 h de las bacteriocinas producidas por cepas de <i>B. subtilis</i> contra cepas de <i>Micrococcus luteus</i> en diferentes estudios.	43
4	Análisis de varianza para el crecimiento de <i>B. subtilis</i> , medido como la densidad óptica (DO ₆₀₀).	44
5	Análisis de efectos de factores respecto a la densidad óptica a 600 nm.	45
6	Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana de <i>B. subtilis</i> .	48
7	Análisis de efectos de factores respecto a la actividad antimicrobiana.	48
8	Espectro antimicrobiano de los tratamientos de los extractos en cada paso de pre-purificación de matraz agitado y escalamiento en biorreactor expresado en milímetros (mm).	51
9	Comparación de los extractos obtenidos por fermentación en matraz agitado y del biorreactor de cada etapa de prepurificación.	55

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD DE ESTUDIANTE

Declaro que los datos propios obtenidos en esta investigación fueron generados durante el desarrollo de mi trabajo de tesis de forma ética y que reporto detalles necesarios para que los resultados de esta tesis sean reproducibles en eventuales investigaciones futuras. Finalmente, este manuscrito de tesis es un trabajo original en el cual se declaró y dio reconocimiento a cualquier colaboración o cita textual presentadas en el documento.

IBQ. Rafael Madrigal Chávez

RESUMEN

Bacillus subtilis es una bacteria que sintetiza compuestos antimicrobianos como lipopéptidos, enzimas líticas y bacteriocinas. Este estudio tuvo como objetivo crecer *B. subtilis* ATCC 6633 usando diferentes medios de cultivo para mejorar la producción de péptidos antimicrobianos, evaluar su efecto contra patógenos alimentarios e identificar molecularmente uno de los péptidos. Se realizó una cinética preliminar para evaluar el crecimiento de *B. subtilis* y la relación entre esporulación y producción de péptidos antimicrobianos. Se utilizaron cuatro caldos comerciales: Schaeffer modificado, nutritivo, soya tripticaseína y Luria Bertani, se evaluó el crecimiento y producción de sustancias antimicrobianas cada 72 h. Se utilizó el método de gota en agar suave a partir del extracto libre de células de *Bacillus* y *Micrococcus luteus* como indicador, para seleccionar el medio con mejor producción de péptidos antimicrobianos. Se empleó un diseño factorial 3^2 , añadiendo extracto de levadura (%): 0.0; 0.5; 1.0 % y la relación Mg^{2+}/Mn^{2+} (g/L) :0.5/0.1; 1.0/0.2 y 1.5/0.3, a cada uno de los medios. Las variables de respuesta fueron el crecimiento de *B. subtilis* y la actividad antimicrobiana. La fermentación se realizó a 37 ± 1 °C, pH de 7.0 ± 0.2 , a 200 ± 10 rpm. La mayor producción de compuestos antimicrobianos se logró al agregar al caldo soya tripticaseína 1.0% de extracto de levadura y 0.5/0.1 g/L de $MgSO_4/MnSO_4$, obteniendo halos de inhibición de *M. luteus* de 24.40 ± 1.13 mm después de 48 h. El extracto antimicrobiano logró inhibir los patógenos *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, con zonas de inhibición de 10.70 ± 0.20 mm y 14.20 ± 0.40 mm, respectivamente, aunque *Escherichia coli* no fue inhibido. Es probable que el péptido antimicrobiano sea la subtilina, ya que la cepa utilizada sólo produce este péptido, lo cual se confirmó mediante la identificación del gen estructural. Los péptidos redujeron la población de *S. aureus*, inoculado en carne de cerdo almacenada a 4 °C por 10 días, en 2 log UFC/g, respecto al control sin agentes antimicrobianos. Estos resultados sugieren que la acción antimicrobiana de la bacteriocina producida podría tener una aplicación en la industria alimentaria.

Palabras clave: *B. subtilis*, péptidos antimicrobianos, fermentación, subtilina.

ABSTRACT

Bacillus subtilis is a bacterium that synthesizes antimicrobial compounds such as lipopeptides, lytic enzymes, and bacteriocins. This study aimed to culture *B. subtilis* ATCC 6633 using different growth media to enhance the production of antimicrobial peptides, evaluate their effect against foodborne pathogens, and molecularly identify one of the peptides. A preliminary kinetic study was conducted to assess the growth of *B. subtilis* and the relationship between sporulation and antimicrobial peptide production. Four commercial broths were used: modified Schaeffer, nutrient, soy trypticasein, and Luria Bertani, and the growth and production of antimicrobial substances were evaluated every 72 hours. The soft agar spot method was used with cell-free extracts of *Bacillus* and *Micrococcus luteus* as indicators to select the medium with the best production of antimicrobial peptides. A 3² factorial design was employed, adding yeast extract (%): 0.0; 0.5; 1.0%, and the Mg²⁺/Mn²⁺ ratio (g/L): 0.5/0.1; 1.0/0.2; and 1.5/0.3 to each of the media. The response variables were the growth of *B. subtilis* and antimicrobial activity. Fermentation was carried out at 37±1 °C, pH 7.0±0.2, and at 200±10 rpm. The highest production of antimicrobial compounds was achieved by adding 1.0% yeast extract and 0.5/0.1 g/L of MgSO₄/MnSO₄ to the soy trypticasein broth, resulting in inhibition zones of 24.40±1.13 mm against *M. luteus* after 48 hours. The antimicrobial extract was able to inhibit the pathogens *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus*, with inhibition zones of 10.70±0.20 mm and 14.20±0.40 mm, respectively, although *Escherichia coli* was not inhibited. It is likely that the antimicrobial peptide is subtilin, as the strain used only produces this peptide, which was confirmed by the identification of the structural gene. The peptides reduced the population of *S. aureus* in pork stored at 4 °C for 10 days by 2 log CFU/g compared to the control without antimicrobial agents. These results suggest that the antimicrobial action of the bacteriocin produced could have an application in the food industry.

Keywords: *B. subtilis*, antimicrobial peptides, fermentation, subtilin.

1. INTRODUCCIÓN

Los aditivos alimentarios son sustancias que se agregan a los alimentos con un fin específico, generalmente para aumentar su vida de anaquel o darle un valor agregado al alimento. El uso de estos aditivos está estrictamente regulado y deben declarar su contenido en las etiquetas alimentarias (Gómez & Araujo-Burgos, 2021).

Por otro lado, existe la preocupación por los efectos adversos a la salud con el uso de aditivos químicos en los alimentos, por consecuencia, los consumidores prefieren optar por los alimentos naturales y “más frescos” que no utilizan conservadores químicos añadidos. Además, el aumento de la demanda de alimentos mínimamente procesados con una vida útil prolongada ha despertado el interés por encontrar conservantes naturales, cuyas cualidades equivalen o sobrepasen a los conservadores químicos (Chen & Hoover, 2003).

Los péptidos antimicrobianos como las bacteriocinas son conservadores naturales sintetizados por bacterias como *Bacillus subtilis*. Esta bacteria podría proporcionar actividad bactericida y bacteriostática contra microorganismos no deseados, aumentando la seguridad y vida útil de los alimentos. Las bacteriocinas han demostrado ser eficaces contra bacterias Gram-positivas como *Listeria monocytogenes*, causante de listeriosis, razón por la se han utilizado ampliamente en alimentos frescos (Chen & Hoover, 2003; Keymanesh et al., 2009).

El objetivo general de este proyecto fue investigar la producción de péptidos antimicrobianos por *B. subtilis* ATCC 6633 a través de una fermentación sumergida en matraz agitado. Se emplearon diferentes medios de cultivo para evaluar el crecimiento microbiano y la producción de péptidos antimicrobianos, así como el efecto de una fuente adicional de nitrógeno orgánico y la presencia de iones Mg/Mn, conocidos por mejorar la producción de bacteriocinas en bacterias ácido-lácticas. Se observaron condiciones específicas de fermentación, como la temperatura, el pH, la aireación y la agitación. Además, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antimicrobiana y se identificó un péptido específico a través de la amplificación del gen *SpaS*.

2. ANTECEDENTES

2.1. *B. subtilis*

El género *Bacillus* tiene algunas características particulares para la formulación de productos biotecnológicos, de las cuales destaca su capacidad para formar endosporas resistentes al calor y desecación (Villarreal-Delgado et al., 2018). También destaca su diversidad en propiedades fisiológicas, además de su capacidad para producir una gran cantidad de distintos compuestos antimicrobianos (AMCs). Este género tiene una distribución ubicua en el suelo, ambientes acuáticos, alimentos y microbiota intestinal de artrópodos y mamíferos (Caulier et al., 2019). En cuanto a su metabolismo, tiene la capacidad de catabolizar un amplio rango de carbohidratos por las vías de Embden-Meyerhof-Parnas (glucólisis) y de pentosas fosfato. Además presenta la habilidad para desarrollarse en ausencia de oxígeno a través de la reducción de nitratos o por fermentación en medios ricos en proteína, glucosa y piruvato (Priest, 2014).

B. subtilis no es una bacteria patógena, normalmente se le encuentra asociado con las plantas y su rizósfera (Arnaouteli et al., 2021). Se presenta en forma de pequeñas células vegetativas de menos de 1 μm de ancho, para las cuales la cepa *B. subtilis subsp. subtilis* 168 se considera como organismo modelo. Suelen ser organismos mesófilos y neutrófilos, aunque algunas cepas pueden tolerar un pH de hasta 10 (Caulier et al., 2019). Este microorganismo es reconocido por la Administración de Medicamentos y Alimentos de EUA (FDA por sus siglas en inglés) para su uso en el procesamiento de alimentos como un organismo generalmente reconocido como seguro (GRAS) (Shafi et al., 2017).

2.1.1. Crecimiento y desarrollo de *B. subtilis*

B. subtilis es formadora de esporas, las cuales le confieren resistencia a diversos tipos de estrés y su capacidad de diseminación y prevalencia en los ecosistemas. Es Gram positiva, catalasa positiva, posee forma de bastón, movilidad flagelar y tiene un tamaño variable que va desde los 0.5 μm a 10 μm . Su crecimiento óptimo ocurre a pH 7, es aeróbico o en ocasiones anaerobio facultativo,

presentando un intervalo amplio de temperaturas de crecimiento en el rango de 20-55 °C, siendo su rango óptimo de crecimiento de 30-45 °C (Kovács, 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018). En la Figura (1) se puede apreciar algunas características morfológicas de *Bacillus* spp.

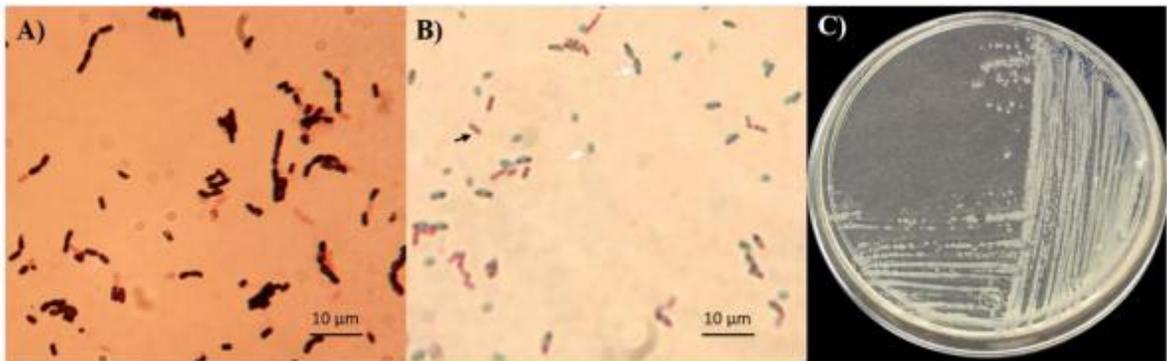


Figura 1. Características morfológicas de *Bacillus* spp. TE3 perteneciente a la Colección de Microorganismos Edáficos y Endófitos Nativo (www.itson.edu.mx/COLMENA). A) Células bacilares, Gram positivas; B) endosporas (flecha blanca) y células bacilares (flecha negra); y C) morfología macroscópica de la cepa TE3 (adaptada de Villarreal-Delgado et al., 2018)

Como se puede observar en la Figura (2), *B. subtilis* es un sistema modelo único de estudio por su capacidad de formar endosporas (Khanna et al., 2021). En el crecimiento vegetativo, la bacteria crece de forma exponencial mediante fisión binaria produciendo dos células hijas de igual tamaño, por encontrarse en un medio con las condiciones favorables para su desarrollo (Khanna et al., 2021; Villarreal-Delgado et al., 2018). La esporulación es una estrategia de supervivencia en presencia de algún tipo de estrés como alta densidad de población, escasez de nutrientes, factores externos como salinidad, temperatura, pH, entre otros. El tabique de división se forma más cerca de un polo para producir una espora más pequeña y una célula madre más grande. Posteriormente, la espora más pequeña conforma la endospora que es liberada por lisis de la célula madre al madurar (Khanna et al., 2021).

La endospora puede permanecer viable en el ambiente hasta que las condiciones son favorables para iniciar sus procesos metabólicos y generar una célula vegetativa (Villarreal-Delgado et al., 2018).

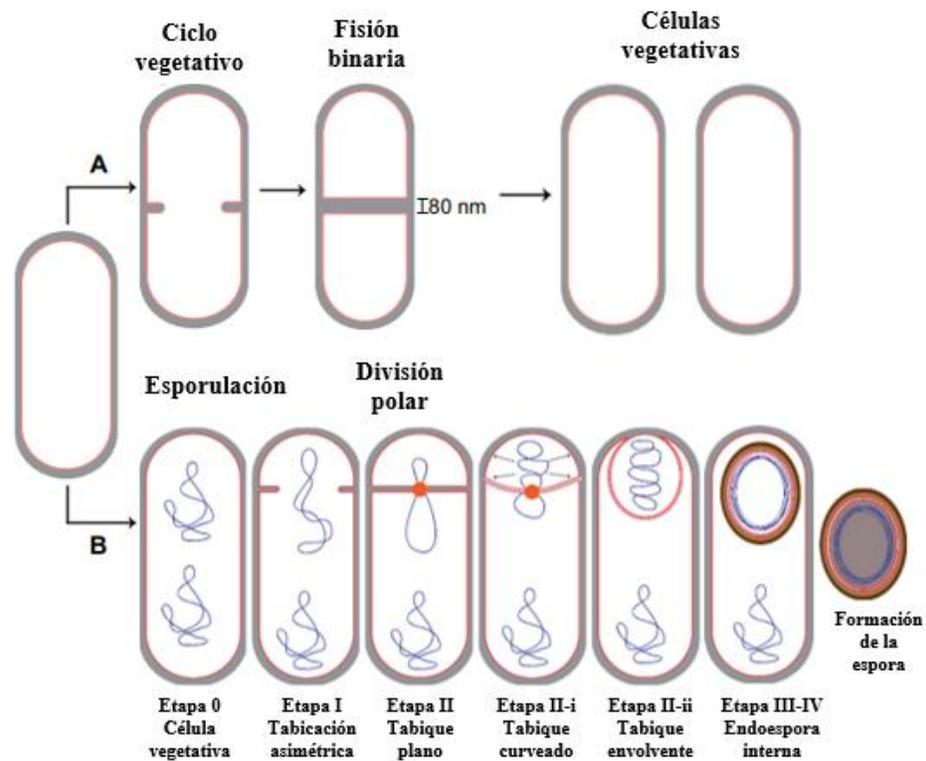


Figura 2. Ciclo de reproducción del género *Bacillus*. A) Ciclo vegetativo, B) esporulación (adaptada de Khanna et al., 2021).

2.1.2. Cinética de crecimiento de *B. subtilis*

Los microorganismos crecen de forma típica, ya que la curva de crecimiento puede ser subdividida en cuatro partes distintas. La primera es la fase de latencia en donde el microorganismo empieza a adaptarse al medio en el que se encuentra, después está la fase exponencial donde los sustratos actúan como nutrientes para el desarrollo óptimo de los microorganismos. Posteriormente entran a la fase estacionaria, disminuyendo su crecimiento debido a que los nutrientes empiezan a limitarse o por el efecto de acumulación de productos tóxicos de metabolismo y reducción del espacio. Finalmente, se da la fase de muerte a causa de diversos

factores ambientales perjudiciales (Smith, 2009). En la Figura (3) se muestra la curva de crecimiento de *B. subtilis*, denotando las diferentes fases, como la fase de adaptación en color negro, donde existe una población de ~10 células/mL. La fase de crecimiento en color azul inicia con el incremento exponencial de la concentración celular, alcanzado el máximo crecimiento en el inicio de la etapa de esporulación llegando a un máximo de concentración en la fase estacionaria de ~10⁷ células/mL en color verde. Posteriormente, la fase de muerte celular en color rojo denotada por el fin de la etapa de esporulación (Mercado & Olmos, 2022a; Sahoo et al., 2016).

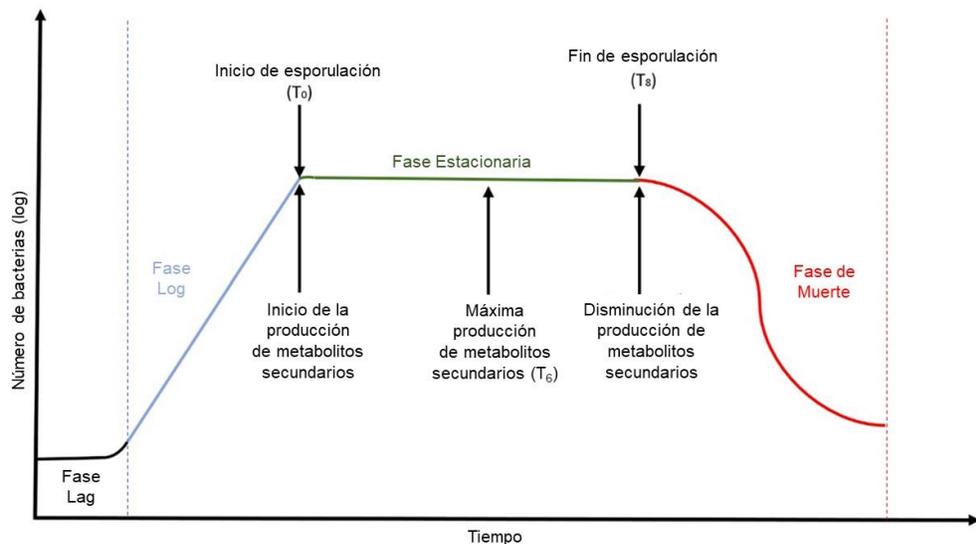


Figura 3. Cinética de crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 (adaptada de Mercado & Olmos, 2022a).

Los compuestos con actividad biológica producidos por *B. subtilis* son altamente efectivos contra muchos patógenos fúngicos; están relacionados con el crecimiento de las plantas y la activación de la resistencia sistémica inducida (ISR), que es un mecanismo de defensa de las plantas. (Shafi et al., 2017).

2.2. Compuestos antimicrobianos producidos por *B. subtilis*

B. subtilis produce metabolitos antimicrobianos, en su mayoría de estructura cíclica, con características hidrofóbicas y enlaces tioéster intramoleculares, así

como enzimas hidrolíticas. Estos pueden ser utilizados como sustitutos de productos químicos y plaguicidas sintéticos. Se tiene una estimación del genoma de *B. subtilis*, del cual se estima que del 4 al 5 % está dedicado a la producción de estos compuestos antimicrobianos. Como se muestra en la Figura (4), los compuestos producidos por *B. subtilis* se han categorizado en clases y éstas clases se han dividido en subclases de acuerdo con su ruta biosintética (Caulier et al., 2019).

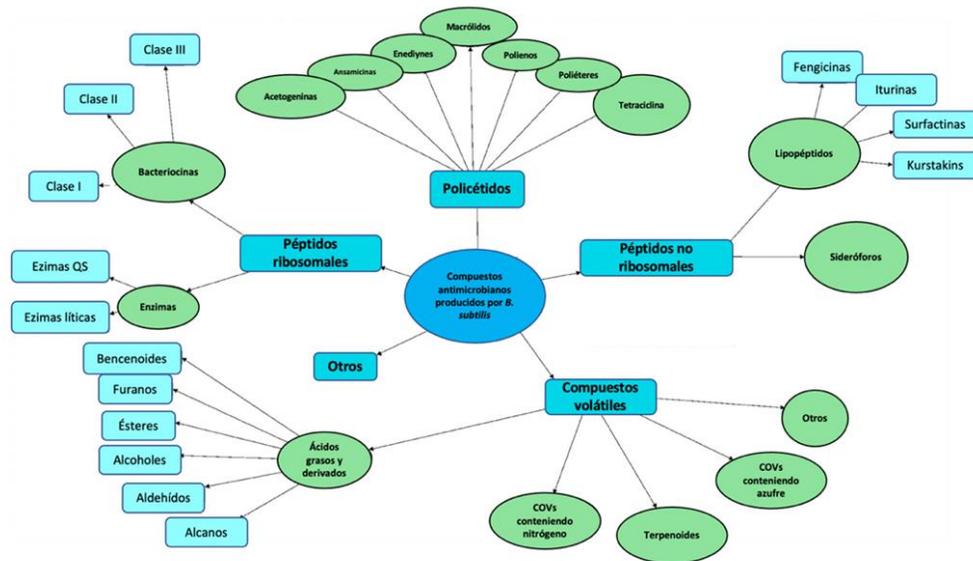


Figura 4. Compuestos antimicrobianos producidos por *B. subtilis* (adaptada de Caulier et al., 2019).

2.2.1. Lipopéptidos

Los lipopéptidos (LPs) son metabolitos bioactivos, comúnmente sintetizados por bacterias del género *Bacillus* y *Pseudomonas*, relacionados directamente con el antagonismo de los patógenos de plantas; su estructura puede ser lineal o cíclica (Villarreal-Delgado et al., 2018).

Los lipopéptidos cíclicos (cLPs) son producidos por enzimas multidominio llamadas sintetetas de péptidos no-ribosomales (NRPSs). Están conformados por un péptido hidrofílico que oscila entre 7 y 25 residuos de aminoácidos unido a una

cadena de ácido graso β -hidroxi o β -amino que generalmente incluyen de 13 a 17 átomos de carbono. Son principalmente no catiónicos, poseen la capacidad de disminuir la tensión interfacial y solubilizar sustancias hidrofóbicas en agua y tienen capacidad antifúngica y antibacteriana, se clasifican en tres familias: iturinas, fengicinas y surfactinas Figura (5). Interactúan con la membrana citoplasmática de células bacterianas o fúngicas, provocando la formación de poros y, por tanto, un desbalance en el equilibrio osmótico, lo que ocasiona la muerte de los organismos patógenos (Balleza et al., 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018).

Al ser moléculas anfipáticas las que componen la membrana de los organismos patógenos, la adsorción de los cLPs a la interface está determinada por interacciones electrostáticas, de este modo se adsorben hacia el exterior y/o se reparten en ambas láminas de la bicapa lipídica Figura (5) (Balleza et al., 2019).

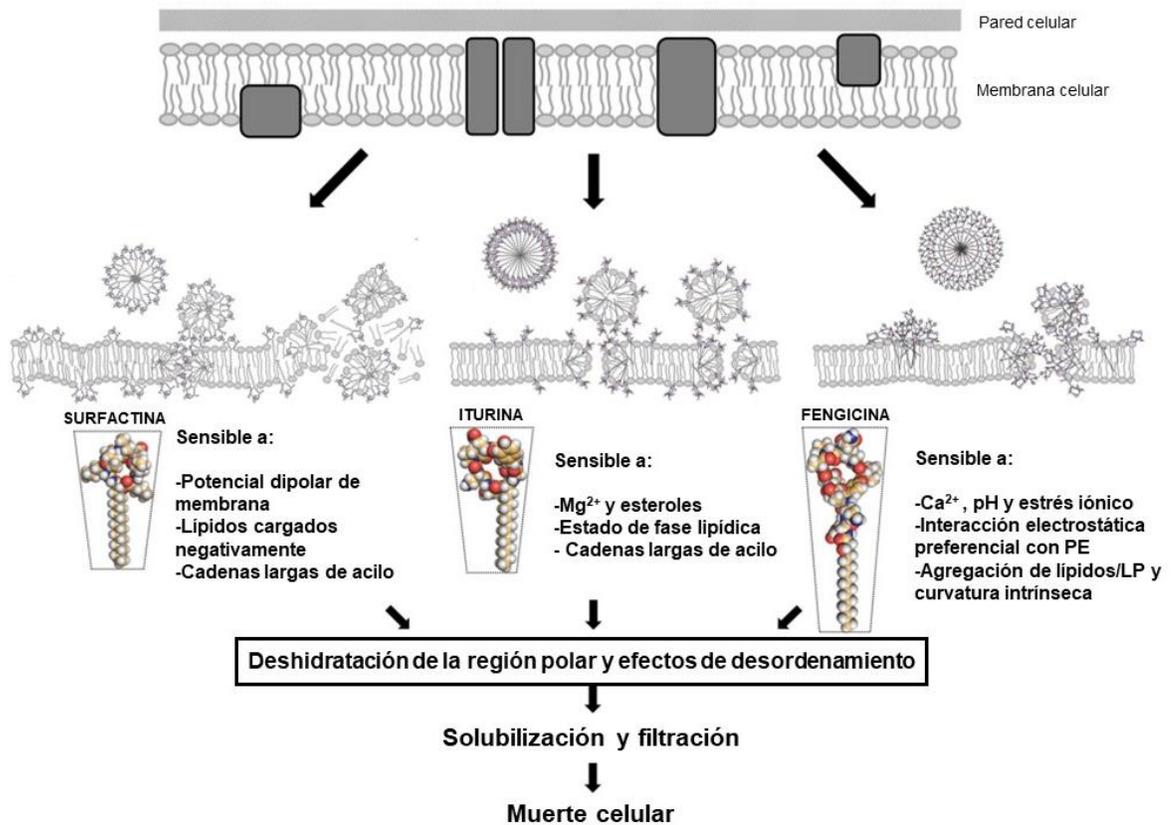


Figura 5. Mecanismo de interacción y disrupción de la membrana celular por surfactina, iturina-A y fengicina, los cLPs bacterianos mejor estudiados (Adaptada de Balleza et al., 2019).

La surfactina, debido a su reducido tamaño, promueve una distribución asimétrica entre los folíolos, que son las unidades individuales que conforman tanto la parte interna como la externa de una hoja compuesta. Esta distribución desorganiza los lípidos de la membrana, lo que a su vez favorece la permeabilidad gracias a su efecto detergente. De manera similar, Iturina-A permite la permeabilidad iónica de la membrana debido a la formación de poros conductores de iones (Balleza et al., 2019). Se ha observado el efecto de la surfactina purificada principalmente en la inducción de la resistencia en diferentes huéspedes contra diversas enfermedades. Esta sustancia estimula las respuestas inmunitarias de las plantas, por ejemplo, en suspensiones de células de vid y tabaco (Farace et al.,

2015; Jourdan et al., 2009) y en plantas de tomate, donde induce resistencia sistémica (ISR) contra *Botrytis cinerea* (Cawoy et al., 2014).

Los agregados de fengicinas, además de promover la curvatura de ambas láminas inducen el adelgazamiento de la bicapa y por consiguiente la muerte celular al aumentar la permeabilidad celular. En todos los casos, la inserción del anillo peptídico provoca una alteración transitoria de la membrana o un trastorno local de la bicapa, lo que conduce a cambios en la permeabilidad (Balleza et al., 2019; Deleu et al., 2005).

2.2.2. Sideróforos

Los sideróforos, como la bacillibactina, son metabolitos secundarios que actúan como quelantes de hierro disminuyendo su biodisponibilidad y formando complejos Fe^{3+} -sideróforo a través de la membrana celular de *B. subtilis*. Este mecanismo le permite antagonizar el crecimiento de otros microorganismos circundantes como, por ejemplo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* (Caulier et al., 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.2.3. Enzimas

2.2.3.1. Enzimas involucradas en la percepción en quorum (PQ)

El mecanismo de apagado en quorum (QQ) tiene la capacidad de silenciar o bloquear la PQ. Las N-acil-homo serina lactonas (AHL) son los auto inductores de señales más caracterizados en bacterias Gram-negativas, son moléculas compuestas por una cadena lateral de ácido graso y una homo serina lactona. La concentración de AHL aumenta para que todas las células coordinen sus actividades metabólicas como la formación de biopelículas, esporulación, factores de virulencia o producción de antibióticos. Las enzimas responsables del QQ son las lactonasa, descarboxilasa, acilasa y desaminasa que pueden inactivar las AHL, Figura (6). Las AHL-lactonasas de *B. subtilis* han atraído gran interés para el control biológico porque afectan el crecimiento de plagas microbianas nocivas como

Pectobacterium carotovorum subsp. *carotovorum* causante de la pudrición blanda de la papa (Caulier et al., 2019).

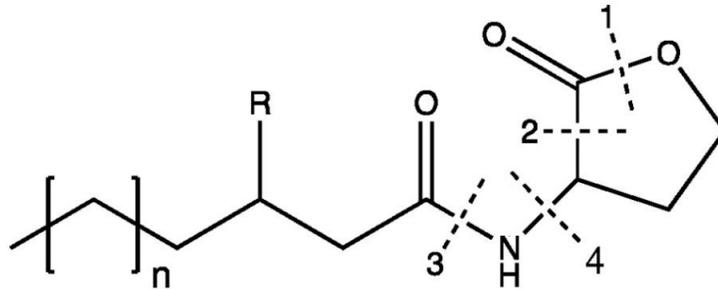


Figura 6. Estructura de AHLs y sus correspondientes degradaciones enzimáticas por QQ. Las líneas discontinuas muestran los sitios de escisión de cuatro enzimas: (1) lactonasa; (2) descarboxilasa; (3) acilasa; (4) desaminasa (Adaptada de Caulier et al., 2019).

2.2.3.2. Enzimas líticas

Las enzimas líticas son otro de los mecanismos de control biológico contra patógenos de origen fúngico, incluyen celulasas, glucanasas, proteasas y quitinasas. Se les conoce como enzimas degradadoras de la pared celular (por sus siglas en inglés: CWDE). Como se puede observar en la Figura (7), estas enzimas tienen la capacidad de hidrolizar los enlaces glucosídicos de los polisacáridos que componen la pared celular de patógenos de origen fúngico. La fracción de polisacáridos que compone la pared celular de hongos puede encontrarse conformada hasta por un 80%, principalmente de quitina (~ 10 – 20%) y glucano (~ 50 – 60%). Los glucanos están compuestos por residuos de β -1,4-N-acetilglucosamina y β -1,3-glucosa respectivamente (Caulier et al., 2019; Villarreal-Delgado et al., 2018).

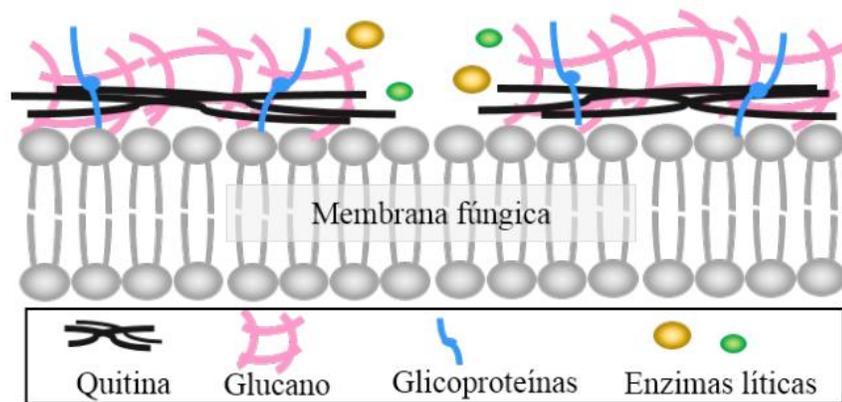


Figura 7. Esquema de lisis de la pared celular de hongos fitopatógenos por acción de las enzimas líticas (adaptada de Villarreal-Delgado et al., 2018).

2.2.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son péptidos con acción antimicrobiana de origen ribosomal, que pueden ser modificados o no después de la etapa de traducción (Burg et al., 2017). Tanto las bacterias Gram-positivas como las Gram-negativas tienen la capacidad de producir bacteriocinas de forma extracelular, y se estima que al menos el 99% de las bacterias conocidas son capaces de sintetizar al menos una bacteriocina. Pueden actuar contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, siendo algunos patógenos susceptibles, como *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* y *Salmonella* spp (Heredia-Castro et al., 2017). En la Figura (8) se muestra la clasificación general de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas, como *B. subtilis*.

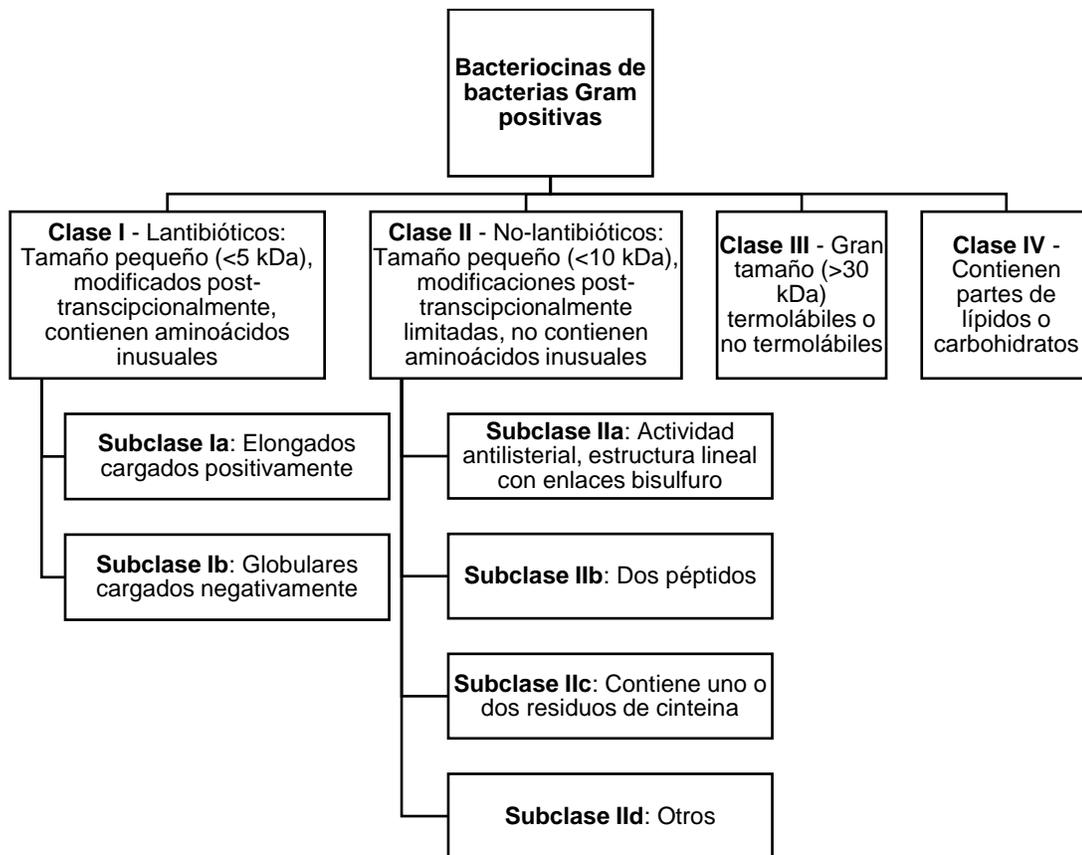


Figura 8. Clasificación general de las bacteriocinas producidas por bacterias Gram positivas (adaptada de Simons et al., 2020).

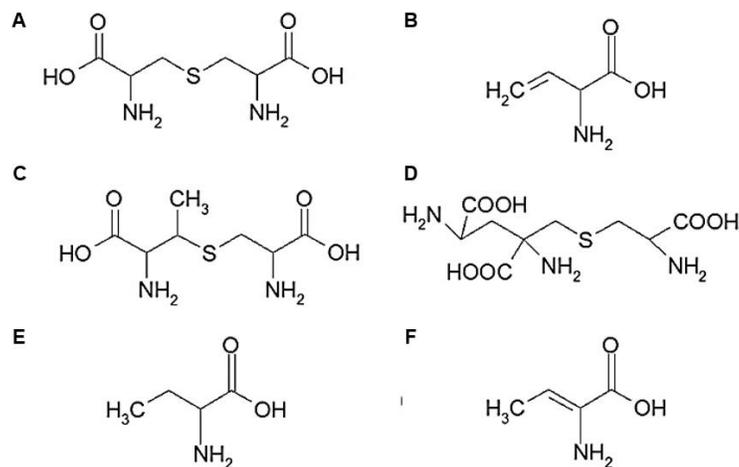


Figura 9. Aminoácidos inusuales (A) lantionina, (B) deshidroalanina (Dha), (C) β -metillantionina, (D) labionina (Lab), (E) ácido aminobutírico (Abu) y (F) dehidrobutirina (Dhb) (adaptada de Simons et al., 2020).

Como se muestra en la Figura (10), las lantioninas, que son el precursor de la subtilina y la nisina, contienen residuos de serina, treonina y cisteína en posiciones que les permiten pasar por una serie de pasos de deshidratación y entrecruzamiento, para producir la subtilina madura (Abriouel et al., 2011; Caulier et al., 2019).

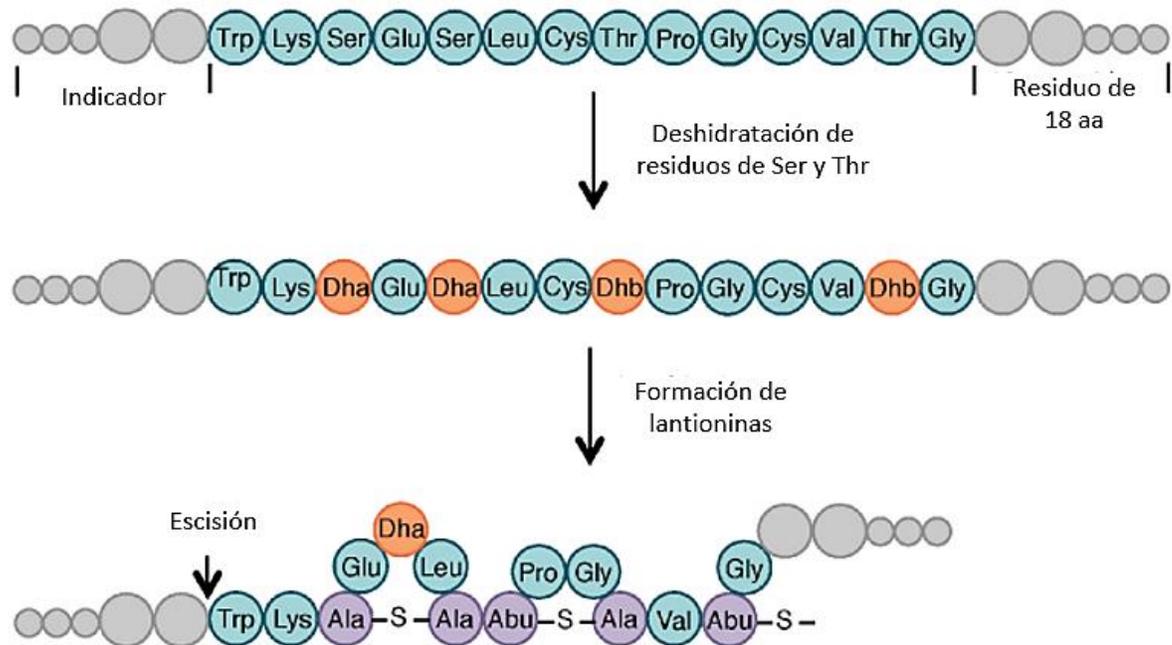


Figura 10. Vía general de la biosíntesis de lantioninas (adaptada de Caulier et al., 2019).

2.2.4.1. Subtilina

B. subtilis ATCC 6633 es una cepa de *Bacillus* spp. que se ha demostrado que produce la bacteriocina subtilina de manera natural (Halami, 2019; van Tilburg et al., 2020). En 1911-1912, Kellerman aisló la cepa productora de subtilina, que fue luego depositada como cepa No. 6633 de *B. subtilis* en la Colección Americana de Cultivos Tipo (American Type Culture Collection, ATCC) por el "Buró de la Industria de Plantas, Suelos e Ingeniería Agrícola" ("Bureau of Plant Industry, Soils, and Agricultural Engineering") del Departamento de Agricultura de los EUA (Helfrich et al., 2022). La subtilina es un péptido antimicrobiano producido por esta bacteria

que puede inhibir el crecimiento de otras bacterias, incluyendo cepas patógenas (Mercado & Olmos, 2022a). Esta propiedad ha llevado al interés en el uso de la subtilina como un conservante natural para alimentos y productos agrícolas, así como para el desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos (Xin et al., 2021a).

2.2.4.1.1. Identificación molecular de la subtilina

La identificación precisa del gen SpaS es esencial para identificar la capacidad de producción de subtilina en *B. subtilis*. Este proceso puede seguirse mediante técnicas de biología molecular. Primero, se extrae el ADN genómico de la cepa de *B. subtilis* de interés; a continuación, se diseñan cebadores específicos para amplificar el gen SpaS y se realiza una “reacción en cadena de la polimerasa” (PCR). Los productos se separan en gel de agarosa y, si es necesario, se someten a secuenciación para confirmar la secuencia. La comparación con secuencias de referencia permitirá determinar la presencia del gen SpaS en la cepa estudiada. Sin embargo, la identificación del gen SpaS no garantiza automáticamente la producción de subtilina, ya que esto depende de otros factores regulatorios como la similitud con otros genes, mutaciones, regiones repetitivas o variables, secuencias no codificantes, variantes génicas, contaminación de la muestra y genes no caracterizados previamente. Por lo tanto, se requieren pruebas adicionales para confirmar la producción de subtilina (Dabiré et al., 2021; Epparti et al., 2022; Zhang et al., 2022).

El locus-*spa* (*spa*BTCSIFEGRK, ~12 kb) de subtilina está compuesto por 10 genes que se transcriben en cuatro unidades transcripcionales (Zhang et al., 2022), tal y como se representa en la Figura (11).

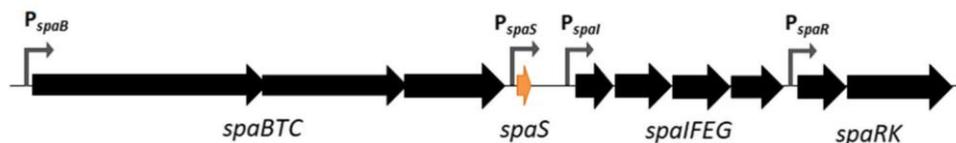


Figura 11. Organización genética del grupo de genes de subtilina (adaptada de Zhang et al., 2022).

Los promotores de cada unidad transcripcional están indicados con flechas grises. El promotor P_{spaS} precede al gen estructural *spaS*; P_{spaB} lidera el operón *spaBTC* que codifica las proteínas que están involucradas en la modificación y exportación del prepéptido de subtilina. P_{spal} es el que controla los genes de inmunidad *spalFEG* que sirven para la autoprotección de *Bacillus* y P_{spaR} impulsa la expresión de *spaRK* para el sistema regulador de dos componentes *SpaRK* (Zhang et al., 2022).

El grupo de genes *spaBTC*SIFEGRK codifica un precursor peptídico de 56 aminoácidos que se procesa para producir el péptido subtilina maduro de 32 aminoácidos con masa molecular de 3.319 kDa Figura (12) (Lee & Kim, 2011).

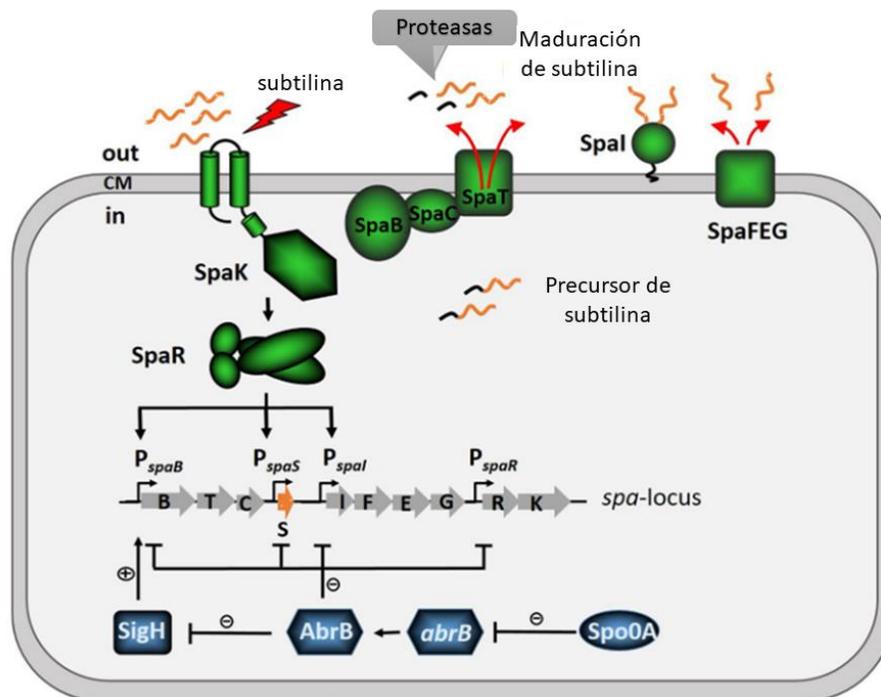


Figura 12. Representación esquemática de la biosíntesis de subtilina, transducción de señales y regulación en *B. subtilis* (adaptada de Zhang et al., 2022).

2.2.4.1.2. Condiciones para la producción de subtilina

En el contexto de la producción de bacteriocinas, como la subtilina, es fundamental considerar diversas estrategias para optimizar su producción y el crecimiento de las cepas bacterianas productoras, como *B. subtilis*. Esta

optimización se logra mediante la selección de medios de cultivo adecuados y la modificación de las condiciones de cultivo. Se ha observado que la elección de medios ricos en nutrientes, como caldos enriquecidos con peptona o extractos de levadura, favorece el aumento del crecimiento bacteriano. Además, la adición de una fuente adicional de carbono orgánico en el medio puede estimular la producción de bacteriocinas al proporcionar un estímulo para la competencia con otras especies microbianas en el entorno (Liu et al., 2015).

La inclusión de sales de magnesio, en forma de sulfato de magnesio en el medio de cultivo se ha revelado esencial para la producción eficiente de bacteriocinas. Esto se debe a que el magnesio (Mg^{2+}) actúa como cofactor para muchas enzimas involucradas en el metabolismo bacteriano, incluidas aquellas responsables de la síntesis de bacteriocinas. La presencia de sulfato de magnesio garantiza un funcionamiento óptimo de estas enzimas, lo que contribuye significativamente a una mayor producción y estabilidad de estas moléculas antimicrobianas. Adicionalmente, se ha observado que otros cofactores metálicos, como el manganeso (Mn^{2+}), también pueden desempeñar un papel crucial en la síntesis de bacteriocinas. La adición de sulfato de manganeso al medio de cultivo puede estimular la actividad de las enzimas relacionadas con la producción de bacteriocinas, lo que resulta en una producción más efectiva (Nikiforova et al., 2016; Todorov et al., 2012; Yang et al., 2018).

La producción de subtilina es regulada a nivel transcripcional por percepción en quorum (PQ, "quorum sensing"), que es el mecanismo de comunicación de célula a célula de algunos microorganismos por medio de la producción de moléculas de señal. Este mecanismo incluye a la propia subtilina como agente auto inductor de su producción (Abriouel et al., 2011). La biosíntesis de la subtilina y la inmunidad en *B. subtilis* están bajo el control dual del sistema de dos componentes (TCS) *spaRK* y el regulador del estado de transición *AbrB* a través del factor sigma alternativo *SigH*. Este factor está encargado de regular de manera positiva la expresión de *spaRK*. En la fase de crecimiento exponencial, el regulador *AbrB* actúa como un represor de la producción de subtilina, y la subtilina se expresa a un nivel bajo (Stein

et al., 2002). Al finalizar la fase exponencial, la síntesis de AbrB es reprimida, seguida de la activación de SigH y, por consiguiente, la activación de TCS *SpaRK* (Barbieri et al., 2016; van Tilburg et al., 2020).

La síntesis de subtilina se produce a través de un complejo proceso biosintético que implica la acción de enzimas y proteínas específicas. La subtilina es sintetizada a partir de una proteína precursora llamada preprosubtilisina, que se transcribe del gen *aprE*. La preprosubtilisina es procesada por una serie de enzimas, incluyendo una endopeptidasa y una serín-proteasa, que eliminan las secuencias de señal y de pro-región para generar la subtilina madura (Zhang et al., 2022).

Al alcanzar la concentración de subtilina un nivel umbral en el medio ambiente, otras células de *B. subtilis* se activan para producir subtilina por PQ. La subtilina ejerce su actividad antimicrobiana al unirse específicamente al pirofosfato de bactoprenilo presente en la membrana de la célula objetivo Figura (13). Este mecanismo provoca la formación de poros que provocan la salida de moléculas y compuestos esenciales y, por lo tanto, la muerte de la célula (Lee & Kim, 2011).

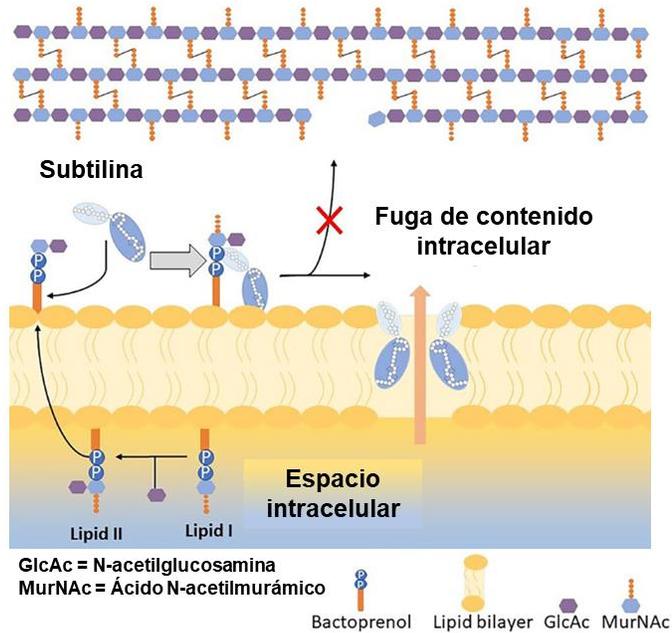


Figura 13. Actividad antimicrobiana de la subtilina (adaptada de Mercado & Olmos, 2022a).

2.3. Aplicaciones de las bacteriocinas

El desarrollo de nuevos aditivos para la conservación de alimentos es crucial para el control de los patógenos que pueden contener los alimentos. En los últimos años, las bacteriocinas han recibido especial atención (Xin et al., 2021b) por su actividad antibacteriana. Las bacteriocinas se han utilizado para reemplazar conservantes químicos y reducir el daño a los nutrientes causado por el tratamiento térmico en los productos alimenticios (Islam et al., 2020; O'Connor et al., 2020).

Se ha demostrado que la aplicación de bacteriocinas en combinación de otros métodos de conservación físicos o químicos afecta positivamente su actividad antimicrobiana. Se pueden añadir como concentrados parcialmente purificados o purificados, lo que requeriría una aprobación específica como conservantes desde el punto de vista legislativo (Balciunas et al., 2013; Nath et al., 2015). Las bacteriocinas muestran alta especificidad contra microorganismos patógenos y baja citotoxicidad frente a las células humanas, presentando la mayor parte de ellas tolerancia a la degradación enzimática y estabilidad a diferentes rangos de temperatura y pH (Mercado & Olmos, 2022b). Las bacteriocinas se degradan en el tracto gastrointestinal por lo que no ingresan al organismo, reafirmando su uso potencial como conservantes de alimentos naturales (O'Connor et al., 2020; Xu et al., 2021).

Los alimentos pueden adicionarse con bacteriocinas producidas *ex situ* que se obtuvieron mediante una fermentación de la cepa productora para después recuperarse adecuadamente. Por otro lado, la producción *in situ* ofrece varias ventajas, tanto en aspectos legales como en costos (Balciunas et al., 2013).

2.3.1. Espectro de inhibición de las bacteriocinas de *B. subtilis* sobre patógenos de alimentos

El espectro antimicrobiano de las bacteriocinas producidas por *B. subtilis* puede ser bastante amplio, ya que estas moléculas antimicrobianas pueden tener diferentes especificidades y objetivos. Puede incluir bacterias Gram-positivas, ya que son más cercanas filogenéticamente y, por lo tanto, más susceptibles a las

bacteriocinas producidas por esta especie. Algunos de los patógenos Gram-positivos que podrían ser afectados por bacteriocinas de *B. subtilis* incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes* (Caulier et al., 2019; Nath et al., 2015).

Sin embargo, no suelen tener un efecto significativo sobre bacterias Gram-negativas debido a las barreras físicas, como la membrana externa, que protegen a estas bacterias. Las bacterias Gram-negativas suelen ser más resistentes a las bacteriocinas producidas por bacterias Gram-positivas como *B. subtilis* (Simons et al., 2020).

Es importante tener en cuenta que el espectro antimicrobiano de una bacteriocina específica puede variar según la cepa que la produzca y la variante estructural de la bacteriocina, así como las condiciones ambientales. Por lo tanto, la actividad antimicrobiana de las bacteriocinas de *B. subtilis* puede ser objeto de investigación y optimización en aplicaciones específicas, como la conservación de alimentos o la inhibición de patógenos en la agricultura (Verma et al., 2022).

2.3.2. Criterios de selección y seguridad de las bacteriocinas para ser utilizadas en la conservación de alimentos

Existen diversas características deseables para seleccionar una bacteriocina que será utilizada en la aplicación de conservación de alimentos (Johnson et al., 2018), los cuales son:

- Seguridad para consumidores e inocuidad para la microbiota intestinal de los consumidores,
- Amplio espectro antibacteriano de la bacteriocina contra el organismo que deteriora los alimentos,
- Resistencia a las enzimas presentes en las matrices alimentarias, y
- Estabilidad térmica y actividad en una amplia gama de pH y concentración de sal, para su inclusión en una amplia gama de sistemas alimentarios.

B. subtilis es actualmente utilizado extensivamente para la producción comercial de diversas proteínas, pero ha sido relativamente poco explorado como

posible chasis microbiano para la producción de lantibióticos. A pesar que tiene un estatus GRAS como *L. lactis* y es capaz de crecer a densidades celulares más altas sin acidificación del medio, al igual que *E. coli*, una gran ventaja de utilizar *B. subtilis* como anfitrión de producción es su alta capacidad natural de secreción (van Tilburg et al., 2020).

La nisina producida por *L. lactis*, que es la única bacteriocina parcialmente purificada utilizada en el mercado, puede ser utilizada de manera segura a una concentración menor a 83.25 mg/kg, en humanos (Zhang et al., 2020).

2.4. Fermentación sumergida

La fermentación sumergida es un cultivo microbiano a una concentración conocida, utiliza sustratos líquidos de flujo libre, principalmente fuentes de carbono y nitrógeno orgánico. Los metabolitos son excretados por los microorganismos en el caldo de fermentación. Esta técnica de fermentación es más adecuada para microorganismos que requieren contenido de humedad elevado, como las bacterias. Además, la purificación de los productos es sencilla y se extraen principalmente metabolitos secundarios que deben utilizarse en forma líquida (Subramaniyam & Vimala, 2012).

Los parámetros a controlar en la fermentación sumergida son: temperatura, agitación, pH, fuente de carbono y nitrógeno, y la composición del medio, siendo esta última muy necesaria a la hora de seleccionar los metabolitos que se desea obtener (Fazenda et al., 2008).

Para llevar a cabo el proceso de fermentación en general se utiliza un recipiente de vidrio o acero inoxidable llamado biorreactor en cual, asegura que la operación se realice de forma aséptica. En la Figura (14) se puede observar un biorreactor con sus principales componentes (Candía-Sanchez et al., 2017).

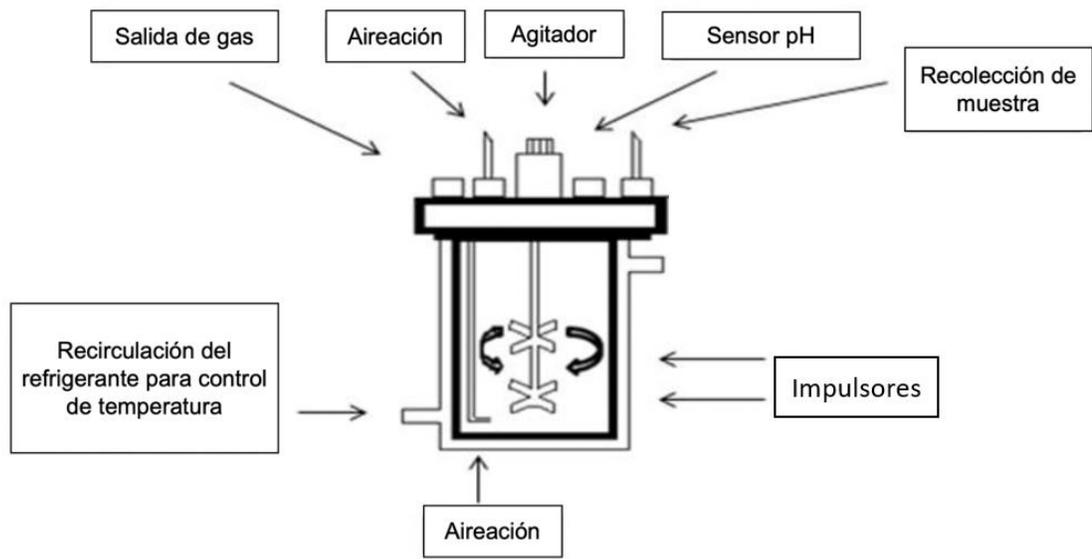


Figura 14. Biorreactor de tanque agitado (adaptada de Candia-Sanchez et al., 2017).

3. JUSTIFICACIÓN

Las aplicaciones de péptidos antimicrobianos producidos por bacterias como las bacteriocinas utilizadas como compuestos de origen natural para su uso como nuevos conservadores es relevante. Los alimentos naturales o mínimamente procesados son deseables para los consumidores y adicionalmente, *B. subtilis* es reconocido por la FDA, para su uso en las industrias de procesamiento de alimentos como un organismo GRAS.

Microorganismos patógenos como *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*, son causantes de enfermedades asociadas a los alimentos y en consecuencia ocasionan pérdidas económicas considerables en la industria alimentaria. La industria alimentaria utiliza compuestos antimicrobianos químicos que suelen ser dañinos a largo plazo o en elevadas cantidades para los consumidores. Por otro lado, el uso de métodos térmicos afecta las propiedades organolépticas del producto. Por lo tanto, se requiere el desarrollo de compuestos antimicrobianos más efectivos y seguros.

La cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 puede producir sustancias con actividad biológica como bacteriocinas y enzimas, que pueden utilizarse como agentes antimicrobianos en alimentos. Este estudio profundizó acerca de la identificación de los péptidos antimicrobianos, su aislamiento y determinación de sus actividades biológicas, ya que son compuestos producidos de manera natural. Además de que *B. subtilis* ATCC 6633 es reconocida como segura para su uso en alimentos, evitando así el uso de compuestos químicos que pueden deteriorar el ambiente e impactar en la salud del consumidor. Por ello, este proyecto consistió en identificar y caracterizar estos compuestos con actividad biológica producidos a través de una fermentación sumergida de *B. subtilis* ATCC 6633.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar la actividad biológica de los péptidos antimicrobianos sintetizados durante la fermentación sumergida de *B. subtilis*.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la concentración de extracto de levadura y la concentración de $MgSO_4/MnSO_4$ para aumentar la síntesis de péptidos antimicrobianos durante el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633.
- Evaluar el espectro antimicrobiano del extracto de péptidos producido por *B. subtilis* ATCC 6633.
- Identificar y evaluar la actividad biológica del extracto de péptidos sintetizados por *B. subtilis* ATCC 6633 en un alimento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

La cepa de *Bacillus spizizeii sb subtilis* ATCC 6633 fue adquirida de la colección de cultivos de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las cepas de *Staphylococcus aureus* 8855, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus cereus* 1997, *Escherichia coli* y *Micrococcus luteus* NCBI8166, fueron proporcionadas por el Laboratorio de Biotecnología del Departamento de Investigación y Posgrado en Alimentos de la Facultad de Química.

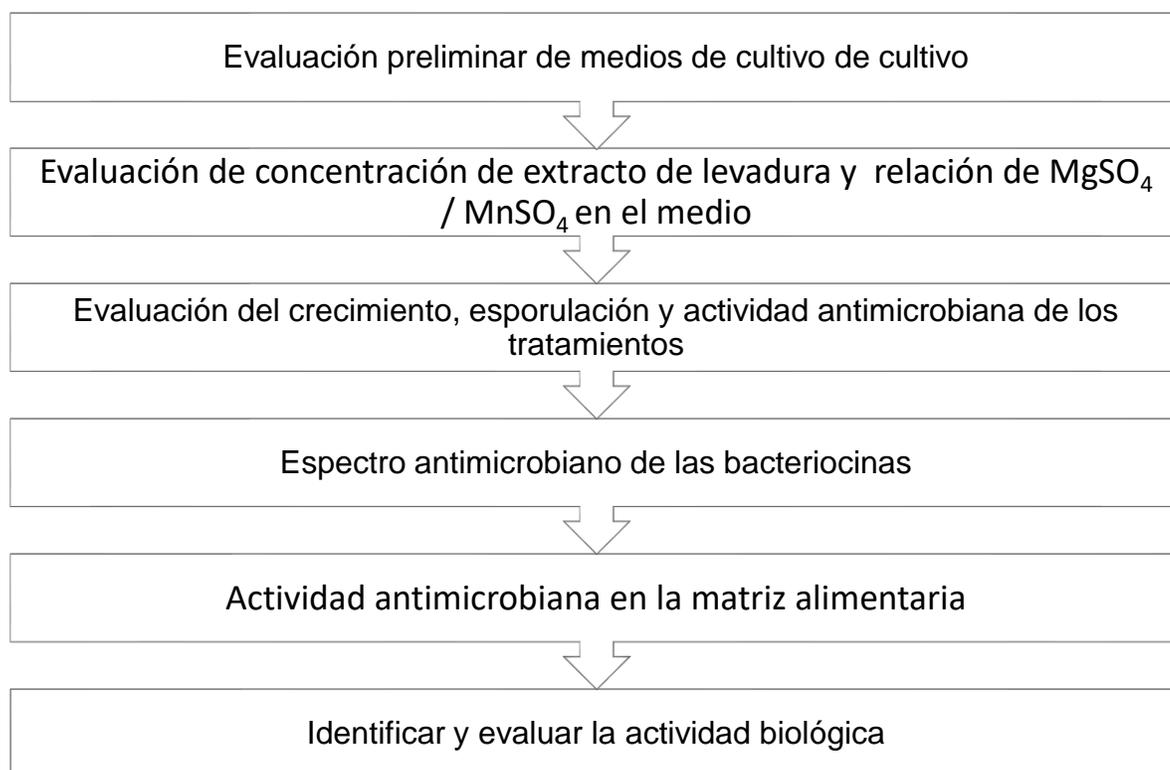
5.2. Reactivos, medios de cultivo y geles para electroforesis

El antiespumante grado alimenticio Antifoam se obtuvo de Provista (Querétaro, México). El extracto de levadura, la seroalbúmina bovina y el azul de Coomassie G-250 se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EUA). El glicerol, NaCl, KCl, telurito de potasio, ácido acético glacial, Tween 20, MgSO₄·7H₂O, MnCl₂, Na₂SO₄, FeSO₄, K₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄ y perlas de NaOH se obtuvieron de J.T. Baker (Center Valley, PA, EUA). La peptona bacteriológica se obtuvo de Oxoid (Basingstoke, Inglaterra). El MnSO₄ se obtuvo de Merck (Darmstadt, Alemania). El H₂SO₄ y el verde de malaquita se obtuvieron de Reactivos Química Meyer (CDMX, México). El azúcar mascabado se obtuvo de Dillis, Técnica Mexicana de alimentación (Estado de México, México). El extracto de carne, agar Baird Parker y agar bacteriológico se obtuvieron de BD Bioxon (México). El caldo Luria Bertani obtenido de US Biological (Boston, MA, EUA). El caldo nutritivo fue obtenido de BD Bacto (Franklin Lakes, NJ, EUA). La safranina se obtuvo de Hycel (Zapopan, Jalisco, México). Los cebadores *SpaS-f*, *SpaS-r*, Agarosa UltraPure™ y TAE 10X se obtuvieron de Invitrogen (Waltham, MA, EUA). El bromuro de etidio, amortiguador de carga, MgCl₂, dNTPs, Taq polimerasa se obtuvieron de Bio-Rad (Hercules, CA, EUA). La leche en polvo 100 % descremada se adquirió de Nestlé (CDMX, México).

5.3. Diseño experimental

El diseño experimental se planteó como un factorial 3^2 con réplica teniendo como factores el porcentaje de extracto de levadura (0.0, 0.5, 1.0 %) y la concentración de la relación de $MgSO_4 / MnSO_4$ (0.5/0.1, 1.0/0.2, 1.5/0.3 g/L). Siendo las variables de respuesta el crecimiento celular evaluado como densidad óptica a 600 nm y la actividad antimicrobiana evaluada por el método de halos de inhibición en milímetros (Hernández-Hernández et al., 2017).

5.4. Diagrama general de la metodología



5.5. Métodos

5.5.1. Conservación de la cepa de *B. subtilis* ATCC 6633 mediante crioconservación

La conservación se realizó en chaquiras (esferas de vidrio de 2 mm) para lo cual, las chaquiras se lavaron previamente con detergente suave y agua destilada

y se sumergieron en una solución de ácido clorhídrico 2 % (v/v) durante 2 h. Se enjuagaron con agua destilada hasta que el pH fue neutro.

Posteriormente se colocaron de 20 a 40 chaquiras de vidrio neutralizadas en viales con tapa de rosca, y se esterilizaron en aire seco a 180 °C durante 1 h en horno (Shell Lab modelo 1350 FX). Se realizaron 3 activaciones de *B. subtilis* ATCC 6633, las dos primeras se realizaron en 5 mL de caldo soya tripticaseína por 12 h incubando a 37 °C. Después de la segunda activación, se inocularon 500 µL del cultivo en 5 mL de caldo soya tripticaseína y se mantuvieron durante 6 h a 200 rpm a 37 °C. Después se aislaron las colonias en medio agar soya tripticaseína para verificar la pureza del cultivo.

Se preparó 1 mL de la mezcla de leche 100 % descremada y glicerol (1:1), con una concentración final de 10 % (v/v) para cada una de las cajas y se agregaron 0.5 mL de la mezcla al tubo inclinado con el cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633. Con ayuda del asa se bajó la suspensión al fondo del tubo. Se tomó la suspensión con la punta de la micropipeta y se depositó en el vial que contenía las chaquiras estériles.

Se agitó suavemente para asegurar que las chaquiras se cubrieran de la suspensión. Posteriormente se removió el exceso de suspensión y se transfirieron las chaquiras a los tubos criogénicos de 1.5 mL en la campana de flujo laminar. Se almacenaron los cultivos en cajas de ultracongelación a -70 °C (Sheu et al., 1993).

5.5.2. Cinéticas preliminares en matraz de 250 mL

Se realizaron 3 activaciones de *B. subtilis* ATCC 6633, las dos primeras se realizaron en 5 mL de caldo soya tripticaseína por 12 h incubando a 37 °C. Después de la segunda activación se inocularon 500 µL del cultivo en 25 mL de caldo soya tripticaseína y se mantuvieron durante 6 h a 200 rpm a 37 °C.

Transcurrido el tiempo se transfirió 1 % (v/v) con $A_{600\text{ nm}} = 1.0$ de la suspensión en el matraz de 250 mL con el medio de cultivo correspondiente.

Las fermentaciones se realizaron por 72 h a 37 °C y 200 rpm, se cuantificó periódicamente la población para determinar la curva de crecimiento y

posteriormente, actividad antimicrobiana para verificar la presencia de las bacteriocinas.

5.5.3. Cinéticas de crecimiento de los tratamientos del diseño experimental

Se realizaron 3 activaciones de *B. subtilis* ATCC 6633, para las dos primeras se realizaron en 5 mL de caldo soya tripticaseína por 12 h incubando a 37 °C. Después de la segunda activación se inocularon 500 µL del cultivo en 25 mL de caldo soya tripticaseína y se mantuvieron durante 6 h a 200 rpm a 37 °C en un agitador orbital (Lumistell, modelo ISO-45, Celaya, Guanajuato, México).

Transcurrido el tiempo se transfirió 1 % (v/v) con $A_{600\text{ nm}} = 1.0$ de la suspensión en 250 mL de caldo soya tripticaseína enriquecido con el extracto de levadura, MgSO_4 y MnSO_4 correspondiente al tratamiento.

Las condiciones del crecimiento fueron 37 °C, pH 7 ajustado utilizando soluciones de HCl 1 M y NaOH 1 M, velocidad de agitación 200 rpm, Las fermentaciones se realizaron por duplicado para cada tratamiento.

Las células se recolectaron mediante centrifugación a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrífuga (Eppendorf 5415-C, Hamburgo, Alemania) y se filtraron a través de una membrana de 0.45 µm (Merck-Millipore, Tullagreen, Carrigtwohill, Irlanda) El sobrenadante libre de células se almacenó a -20 °C para estudios adicionales.

5.5.4. Escalamiento a nivel biorreactor

Se realizaron 3 activaciones de *B. subtilis* ATCC 6633 como se describe en el apartado anterior.

Transcurrido el tiempo se transfirió 1 % (v/v) con $A_{600\text{ nm}} = 1.0$ de la suspensión en el biorreactor con 2 L de caldo soya tripticaseína enriquecido con el extracto de levadura, MgSO_4 y MnSO_4 correspondiente al tratamiento seleccionado.

Las condiciones del crecimiento en biorreactor instrumentado, modelo Z31011001 (Applikon ez-control, Delft, Holanda) fueron 37 °C, pH 7 ajustado automáticamente por el controlador utilizando soluciones de HCl 0.1 M y NaOH 0.1

M, velocidad de agitación 100 rpm, flujo de aire constante a 1.5 L aire/[(min)(L caldo cultivo)](vvm). Para el control de nivel de espuma se utilizó una solución de silicón Antifoam FP al 0.01% (v/v). Mediante los sensores se tomó cada hora las lecturas del pH, temperatura y oxígeno disuelto, además se tomaron muestras de 15 mL cada hora para obtener el extracto libre de células mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y posterior filtración a través de una membrana de 0.45 µm (Merck-Millipore). El sobrenadante libre de células se almacenó a -20 °C para estudios adicionales (Ansari et al., 2012).

5.5.5. Cuantificación de biomasa

La determinación de la biomasa se llevó a cabo en un espectrofotómetro UV-Vis (Thermo Scientific, modelo Genesys 10S) a una longitud de onda de 600 nm. Se tomó 1 mL de muestra directamente de la fermentación cada 3 h. Como blanco se utilizó el medio de cultivo sin inóculo. Todas las mediciones se realizaron por triplicado.

5.5.6. Modelo de Gompertz

El modelo Gompertz es ampliamente conocido y utilizado en biología. Ha sido aplicado para describir el crecimiento en animales, plantas, bacterias y células cancerosas, siendo uno de los modelos sigmoides más utilizados, detrás del modelo logístico. Se ha empleado el modelo de Gompertz en diversos campos, desde el crecimiento de organismos hasta el de tumores y bacterias (Peleg & Corradini, 2011; Tjørve & Tjørve, 2017). Es importante tener en cuenta que el modelo de Gompertz es una simplificación matemática y que su aplicabilidad depende de la adecuación a los datos y las características específicas del fenómeno que se está estudiando. El modelo de Gompertz está dado por la ecuación (1):

$$y = ae^{-e^{-k(x-x_c)}} \quad (1)$$

Donde:

y = Población

a = Capacidad de carga

x= Punto en el tiempo en el que el crecimiento alcanza su máximo

x_c = desplazamiento en el eje X

k = tasa de crecimiento

5.5.7. Concentración de los extractos libre de células

Se colocó a baño maría el extracto libre de células obtenido en la fermentación a una temperatura de 75 °C hasta reducir un 90-95 % del volumen original. Se evitó elevar la temperatura a más de 85 °C y se tuvo agitación constante con un agitador magnético.

El extracto obtenido en el calentamiento se filtró con unidades de filtración por centrifugación con una membrana de 10 kDa (Amicon, Modelo Ultra-4 (Merck-Millipore)). Se obtuvo un filtrado libre de proteínas con peso molecular inferior a 10 kDa y una reducción del volumen de 50 %.

Del filtrado obtenido anteriormente se depositó en tubos siliconados de 1.5 mL, modelo 02-681-320 (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) para pasarlos por el evaporador al vacío Labnet, modelo DYNA-vap 22895a (Edison, NJ, EUA) en condiciones de temperatura de 40 °C y una presión de vacío de 400 mbar hasta lograr una reducción del volumen de la muestra del 50 % debido a la retención de proteínas en el filtro.

5.5.8. Tinción de endosporas con verde de malaquita

Para la tinción se utilizaron las soluciones acuosas de verde de malaquita al 5% y safranina al 1% (Vázquez et al., 2011).

Se colocó el microorganismo en el portaobjetos con ayuda de un asa de platino y se dejó secar al aire para posteriormente cubrir con verde de malaquita por 1 min. Al transcurrir un minuto, se cubrió con papel filtro y utilizando unas pinzas se llevó cerca del fuego de un mechero de alcohol por 5 min para fijar el colorante a las esporas. Se retiró el papel filtro y se lavó el exceso de colorante con agua destilada. Posteriormente, se añadió el colorante safranina por 2 min para contrastar

el color del verde de malaquita y diferenciar las células vegetativas de las endosporas. Por último, se lavó el exceso de safranina con agua destilada. Se observó en el microscopio Leica modelo DM500 (Wetzlar, Alemania) con el objetivo de 100x.

5.5.9. Determinación de la actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de difusión en agar utilizando un microorganismo indicador (Hernández-Hernández et al., 2017). Primero, se preparó agar suave y luego agar duro agregando 0.8 y 1.5 % de agar bacteriológico respectivamente. Se ajustó a un pH final de 7.5 ± 0.2 y se adicionó 2 % de Tween 20 (50 % p/v) como surfactante, después se calentó hasta disolver y se esterilizó en autoclave. Primero se colocó el agar duro de base en la caja Petri y se dejó solidificar. Se inoculó una concentración de 1×10^5 UFC/mL del microorganismo indicador al agar suave realizando una suspensión de las células en solución Ringer a $\frac{1}{4}$ de fuerza. Luego se midió la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm (para *Staphylococcus aureus* 8855, *Listeria monocytogenes* Scott A, *Bacillus cereus* 1997, *Escherichia coli*) y 650 nm (para *Micrococcus luteus* NCBI8166) para obtener valor cercano a 0.3.

Posteriormente se hicieron pocillos con un sacabocados #3 en las placas de agar assay suave y usando un barrenador estéril se retiraron los trozos de agar. Se inocularon 15 μ L del extracto crudo previamente tratado y 15 μ L de caldo como control. Las placas se incubaron a 30 °C por 48 h. El efecto antimicrobiano se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición con un vernier incluyendo el diámetro del pocillo.

5.5.10. Determinación de la concentración de proteína soluble de los extractos por el método de Bradford

Este método para la determinación de la concentración de proteína soluble se basa en la reacción del colorante azul de Coomassie, con los grupos básicos de

los aminoácidos presentes en las proteínas, lo que permite la medición de la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm.

Se elaboró una curva de calibración de 6 puntos con concentraciones de 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9 y 1.0 mg/mL con un estándar de seroalbúmina bovina. Para la curva de calibración se midieron volúmenes triplicados de 10, 30, 50, 70, 90 y 100 μ L de la solución del estándar [1 mg/mL] en tubos de ensaye, se llevó cada uno hasta 100 μ L con agua destilada. Para el blanco se añadieron 100 μ L de agua destilada en otro tubo.

Se agregaron 5 mL del reactivo de Bradford (Preparación en Anexo A) a cada tubo y se mezcló hasta homogeneizar suavemente evitando la formación de espuma y se midió la absorbancia a 595 nm.

Para la determinación de proteína de los extractos, se mezclaron 100 μ L del extracto y 5 mL del reactivo de Bradford, se agitaron los tubos y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm. Las muestras son estables en un tiempo aproximado de 1 h, después de haber llevado a cabo la mezcla. Para calcular la concentración de proteína en las muestras problema, se despejó de la ecuación de la curva estándar, y considerar los factores de dilución pertinentes en cada caso, para expresar los resultados finales en μ g de proteína por mL de extracto (Bradford, 1976). Obtenido el Factor de purificación al dividir la actividad específica de cada paso de purificación entre la actividad específica del extracto libre de células.

5.5.11. Extracción de ADN, evaluación de la calidad e integridad de la extracción

A partir del cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633, se obtuvo el extracto libre de células mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 15 min. Se extrajo el ADN siguiendo el protocolo establecido del kit PowerSoil® DNA Isolation (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, EUA).

Se midió la concentración y pureza del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Para evaluar la calidad e integridad del ADN se realizó una electroforesis en con gel de agarosa al 1% cargando dos blancos de

3 µL de amortiguador de carga 2X y la muestras que contenían 3 µL de amortiguador de carga 2X y 3 µL de la extracción de ADN. Las muestras se cargaron en el gel y se corrió una cámara horizontal de electroforesis marca Bio-Rad, modelo Mini-Subcelda GT (Hercules, CA, EUA), el gel a 100 V, 400 A por 25 min. Posteriormente se sumergió en bromuro de etidio [5 µg/mL] por 30 min y se observó en el fotodocumetador marca Alpha Innotech modelo SA-1000, red (Santa Clara, CA, EUA), con luz UV.

5.5.12. Amplificación del gen estructural *SpaS* de la subtilina por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A continuación, se muestra la secuencia de los cebadores usados para amplificar fragmentos de 566 bp correspondientes al gen *spaS* de la subtilina producida por *B. subtilis* (Velho et al., 2013):

***SpaS-f* (5'-TGTCATGGTTACAGCGGTATCGGTC-3')**

***SpaS-r* (5'-AGTGCAAGGAGTCAGAGCAAGGTGA-3')**

Se llevó a cabo la reacción de PCR utilizando recciones de 50 µ: 5 µL de amortiguador 10X, 3 µL de MgCl₂ [50 mM], 8 µL de dNTPs [2.5 mM], 0.25 µL de *Taq* polimerasa [5 U/mL; Invitrogen], 4 µL del primer *SpaS-f* [10 pM/µL], 4 µL del primer *SpaS-r* [10 pM/µL], 5 µL de la extracción de ADN y 25 µL de H₂O grado HPLC estéril. Se realizó un blanco sin enzima *Taq* polimerasa. La PCR se realizó en un Termociclador (Bio-Rad, modelo MJ Mini) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización por 1 min a 94 °C, alineación por 30 s a 55 °C y elongación por 1 min a 72 °C para un total de 35 ciclos.

Para identificar la amplificación del gen se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 1.5 %. Se cargaron 2 µL del marcador molecular de 1 kb y 2 µL de amortiguador de carga 2X en los pozos a los extremos del gel y la muestras que contenían 4 µL de amortiguador de carga 5X y 16 µL del gen amplificado obtenido en la PCR. Se corrió el gel a 100 V por 25 min. Posteriormente se sumergió en bromuro de etidio (5 µg/mL), por 30 min y se observó en el fotodocumentador Alpha Innotech, con luz UV.

5.5.13. Efecto del extracto concentrado sobre de *S. aureus* en lomo de cerdo.

Se utilizó el extracto concentrado de la fermentación de *B. subtilis* ATCC 6633 del tratamiento D9 compuesto por 1.0% de extracto de levadura y 0.5/0.1 g/L de MgSO₄/MnSO₄, el cual, tuvo la mayor actividad antimicrobiana. La matriz alimentaria utilizada fue lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*), con dimensiones de 4x4x0.5 cm. La carne fue previamente lavada tres veces con agua destilada estéril, luego dos lavados con solución de hipoclorito de sodio a 120 ppm, seguido de 3 lavados con agua destilada estéril, para eliminar los remanentes de cloro.

Se realizaron 3 tratamientos por triplicado, el primer tratamiento consistió en la carne a la cual no se le inoculó el microorganismo ni se le añadió el extracto, al segundo tratamiento se inoculó una concentración de 10⁶ UFC/mL de *S. aureus* y al tercer tratamiento se inoculó con 10⁶ UFC/mL de *S. aureus* y 200 µL del extracto con 106.07 mm de inhibición/g de proteína de actividad específica. La determinación de la población viable se llevó a cabo mediante el método de extensión en superficie sobre placas de agar Baird Parker, enriquecido con 1 % (v/v) de una solución de telurito de potasio al 1 %. Se realizaron diluciones seriadas desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ en agua con diluyente de peptona bacteriológica 1 % (p/v). Posteriormente, se tomó 0.1 mL de las tres últimas diluciones y se extendió con un asa de vidrio estéril sobre placas Petri con agar Baird Parker enriquecido con telurito de potasio. Una vez solidificado se incubó durante 48 h a 37 °C y se realizó el recuento de las unidades formadoras de colonias de *S. aureus* por mL (UFC/mL).

5.6. Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se obtuvo el promedio con la desviación estándar. Se efectuó la prueba de Tukey para comparación de medias con $\alpha \leq 0.05$ utilizando el software Statgraphics Centurion XVI la regresión del modelo de Gompertz utilizando el software OriginPro 2023.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Cinéticas de crecimiento preliminares para evaluar el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633

Se realizaron las cinéticas de crecimiento en matraz de cultivo agitado evaluando el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 por densidad óptica (DO) a 600 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific) y la producción de bacteriocinas mediante las pruebas antimicrobianas utilizando *Micrococcus luteus* NCBI8166 como indicador. Los resultados obtenidos se utilizaron para el siguiente paso de la experimentación.

Estas pruebas preliminares se realizaron relacionar las fases de crecimiento del microorganismo y evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto libre de células durante la fermentación de los cuatro caldos de cultivo seleccionados. Los medios fueron el Schaefer modificado (SM), soya tripticaseína (ST), nutritivo (N) y Luria Bertani (LB). Los valores tanto de la DO como de los halos de inhibición se muestran en el Anexo B y las fotografías de las placas de la evaluación de la actividad antimicrobiana se muestran en el Anexo C.

En la Figura (15) se muestra el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 y la actividad antimicrobiana evaluada mediante la formación de halos de inhibición de *M. luteus* NCBI8166, indicando la producción de compuestos antimicrobianos.

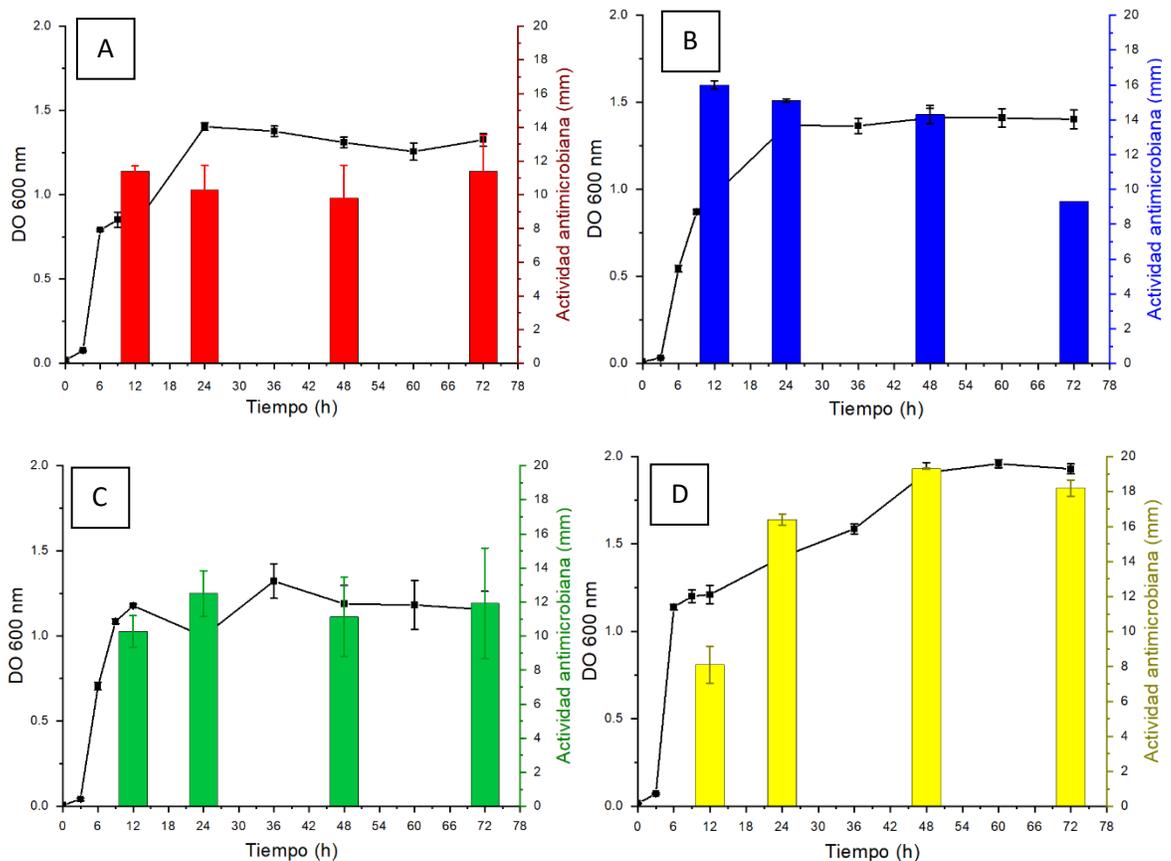


Figura 15. Densidad óptica a 600 nm (Barras) y la actividad antimicrobiana (Líneas) de *B. subtilis* ATCC 6633 en caldo nutritivo (A) Luria Bertani (B), Schaeffer modificado (C) y soya tripticaseína (D). Se presenta el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$.

B. subtilis ATCC 6633 en el caldo ST, mostró una producción de biomasa superior a los otros tratamientos. El valor máximo de absorbancia fue de 1.96 ± 0.02 y una actividad antimicrobiana estable desde las horas 24 h y hasta las 72 h, con una actividad máxima a las 48 h de 19.3 ± 0.03 mm, similares a los valores obtenidos por Wei et al. (2021) y Yao et al., (2019). En el caso de la cepa *B. subtilis* ATCC 6633, se ha demostrado que produce subtilina durante la fase estacionaria y que la producción está regulada por la presencia de nutrientes como la peptona o el extracto de levadura; y otros factores ambientales (Helfrich et al., 2022). El caldo soya tripticaseína, utilizado en las fermentaciones, contiene 17 g de digerido

pancreático de caseína, 3 g digerido papaínico de soya, 2.5 g de dextrosa, 5 g de NaCl y 2.5 g de K_2HPO_4 en la preparación para 1 L. Los componentes como la caseína proporcionan fuentes de nitrógeno y carbono, mientras que el extracto de soya nutrientes adicionales, ambos importantes para el crecimiento del microorganismo. La dextrosa actúa como fuente de energía, el cloruro de sodio regula la salinidad, y los fosfatos intervienen en las rutas metabólicas. Por lo que podemos observar que el caldo soya tripticaseína contiene nutrientes que permitirían la producción de la subtilina.

Los resultados obtenidos se utilizaron para el siguiente paso de la experimentación.

6.2. Efecto de la concentración de extracto de levadura y la concentración de la relación $MgSO_4/MnSO_4$ sobre el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633

Se realizaron las cinéticas de crecimiento en matraz de cultivo agitado de *B. subtilis* ATCC 6633 y la producción de bacteriocinas con los métodos ya mencionados (sección 6.1). Además, se realizó la detección de esporas por tinción con verde de malaquita. La finalidad de estas pruebas fue relacionar la actividad antimicrobiana con las etapas de crecimiento del microorganismo durante la fermentación variando la concentración de extracto de levadura y concentración de la relación de $MgSO_4/MnSO_4$. Los valores tanto de la DO_{600} como de los halos de inhibición se muestran en el Anexo D y las fotografías de las placas de la evaluación de la actividad antimicrobiana se muestran en el Anexo E.

En los estudios realizados por Hassan et al. (2001), relacionados con la producción de antibióticos se encontró que el sulfato de magnesio, el manganeso y el hierro desempeñan un papel crucial en este proceso. La disponibilidad de estas sustancias es clave para la síntesis de proteínas, ya que su agotamiento puede restringir la síntesis y actividad de las enzimas involucradas en la producción de antibióticos. Tal es el caso del catión Mg^{2+} , que es esencial para la síntesis de

proteínas, y su agotamiento puede tener efectos restrictivos sobre la síntesis y actividad de las enzimas involucradas en el proceso.

Las cinéticas de crecimiento se realizaron en matraces de 500 mL siguiendo los tratamientos descritos en el diseño factorial 3² Tabla (1). Se usó el caldo de soya tripticaseína como medio de fermentación enriquecido con extracto de levadura (0.0, 0.5, 1.0 % p/v) y la concentración de la relación con MgSO₄/MnSO₄ (0.5/0.1, 1.0/0.2, 1.5/0.3 g/L). Los tratamientos fueron aleatorizados, siendo la variable de respuesta DO_{600nm} y la actividad antimicrobiana en mm de halo de inhibición.

Tabla 1. Tratamientos del diseño factorial 3² para evaluar las etapas de crecimiento y actividad antimicrobiana de *B. subtilis* ATCC 6633 variando la concentración de extracto de levadura y MgSO₄ / MnSO₄.

Tratamiento	Extracto de levadura (% p/v)	MgSO ₄ / MnSO ₄ (g/L)
D1	0.0	1.0 / 0.2
D2	0.5	0.5 / 0.1
D3	0.5	1.0 / 0.2
D4	1.0	1.0 / 0.2
D5	0.0	1.5 / 0.3
D6	0.5	1.5 / 0.3
D7	1.0	1.5 / 0.3
D8	0.0	0.5 / 0.1
D9	1.0	0.5 / 0.1

En la Figura (16) se muestra el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 evaluado durante la fermentación a 48 h en los 9 tratamientos del diseño experimental.

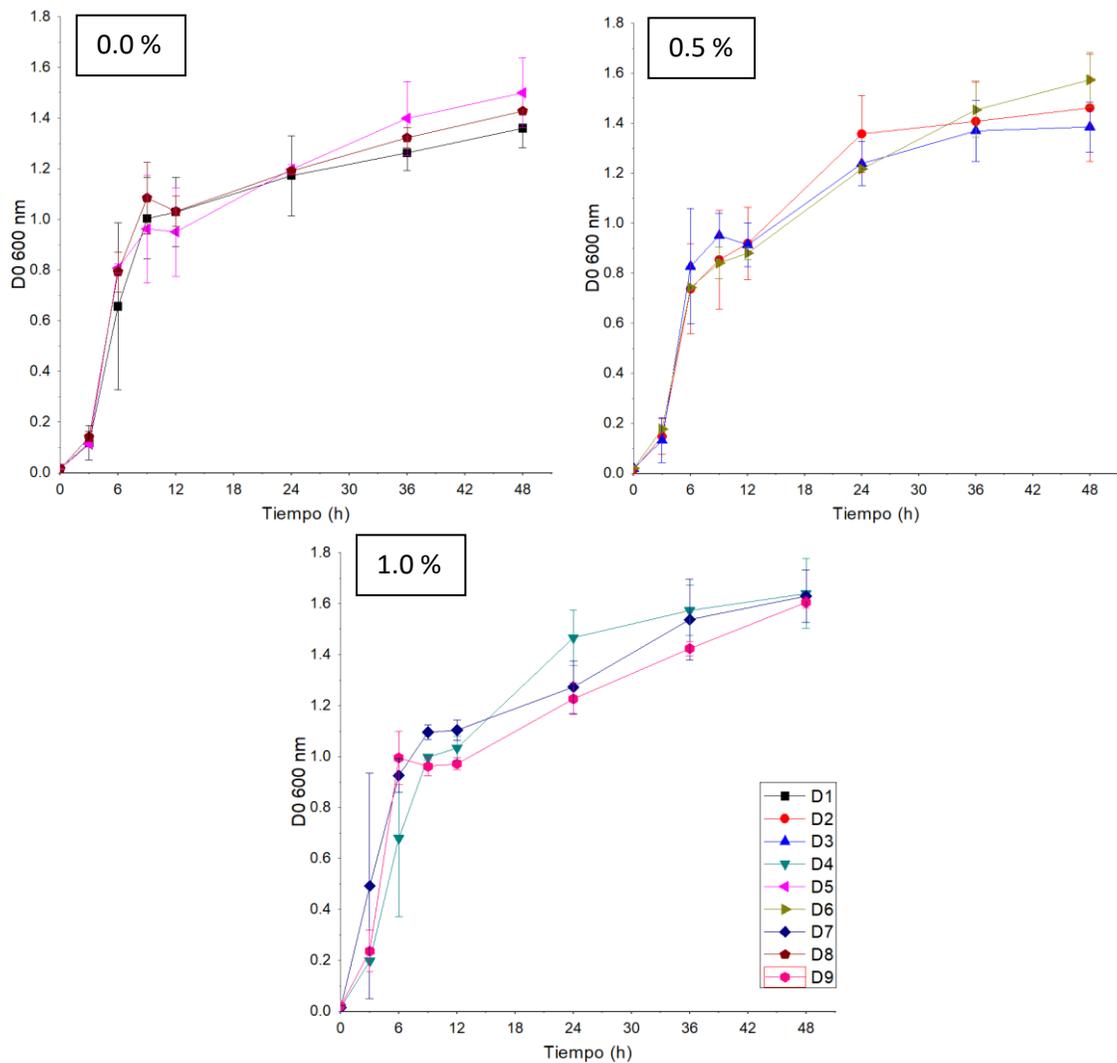


Figura 16. Densidad óptica a 600 nm de *B. subtilis* ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos. D1-D9: tratamientos del diseño experimental (Tabla 1). Extracto de levadura: 0.0%; 0.5 %; 1.0 %. Se presenta el promedio \pm desviación estándar, $n = 3$.

De acuerdo con Kleerebezem et al., (2004), la subtilina es producida por la bacteria *B. subtilis* durante la fase estacionaria, que es un período de tiempo en el que la bacteria ha dejado de crecer y se encuentra en un estado de transición hacia la formación de esporas.

Durante la fase estacionaria, *B. subtilis* produce una variedad de metabolitos secundarios, incluyendo la subtilina como una estrategia de supervivencia en condiciones de estrés nutricional. La producción de subtilina en *B. subtilis* está regulada a nivel de transcripción y se activa en respuesta a señales ambientales, como el agotamiento de nutrientes (Caulier et al., 2019; Mercado & Olmos, 2022a).

Los tratamientos con mayor cantidad de biomasa fueron las cinéticas 4, 7 y 9, con DO máxima a 600 nm de 1.64 ± 0.14 , 1.63 ± 0.10 y 1.65 ± 0.20 , respectivamente. Estos tratamientos corresponden a una concentración de extracto de levadura de 1.0 % p/v, lo cual nos indica que es a la concentración que mejor aprovechan el sustrato del medio comparadas con otros tratamientos (González-Hernández, et al., 2015). Se observó que los tratamientos correspondientes al 1.0 % p/v de extracto de levadura alcanzaron la fase estacionaria a las 6 h y los tratamientos de 0.0 y 0.5 % p/v la alcanzaron hasta las 9 h. Puede decirse que las bacterias en los tratamientos mencionados se adaptan bien y aprovechan los nutrientes del medio fermentativo ya que el inicio de su fase exponencial es en un tiempo menor que el de los otros tratamientos con 0.0 y 0.5 % p/v de extracto de levadura. Por lo tanto, tienen la capacidad de duplicarse con mayor velocidad.

6.2.1. Modelo de Gompertz

Los resultados del análisis del crecimiento por el modelo de Gompertz de todos los tratamientos se muestran en la Tabla (2). Dicho modelo nos indica cuales tratamientos se ajustan mejor al crecimiento microbiano, como se muestra en la Figura (17), los tratamientos que mejor se ajustan al modelo de crecimiento son el D2, el cual consistió en CST con 0.5 % p/v de extracto de levadura y 0.5 / 0.1 g/L de MgSO_4 / MnSO_4 ; y el D4, compuesto por 1.0 % p/v de extracto de levadura y 1.0 / 0.2 g/L de MgSO_4 / MnSO_4 .

Tabla 2. Parámetros cinéticos de desarrollo de *B. subtilis* en los tratamientos del diseño experimental y estimados apartir del Modelo de Gompertz.

Tratamiento	a	xc	k	R ² Ajustada
D1	1.359±0.220	6.044±2.910	0.103±0.062	0.776
D2	1.461±0.130	6.951±1.482	0.129±0.044	0.911
D3	1.385±0.139	6.196±1.638	0.148±0.061	0.855
D4	1.640±0.137	7.410±1.460	0.123±0.039	0.923
D5	1.499±0.240	7.542±2.959	0.101±0.056	0.790
D6	1.574±0.202	8.539±2.457	0.097±0.041	0.875
D7	1.629±0.232	5.467±2.582	0.096±0.050	0.797
D8	1.427±0.259	5.717±3.288	0.098±0.065	0.732
D9	1.605±0.338	6.889±4.017	0.082±0.055	0.739

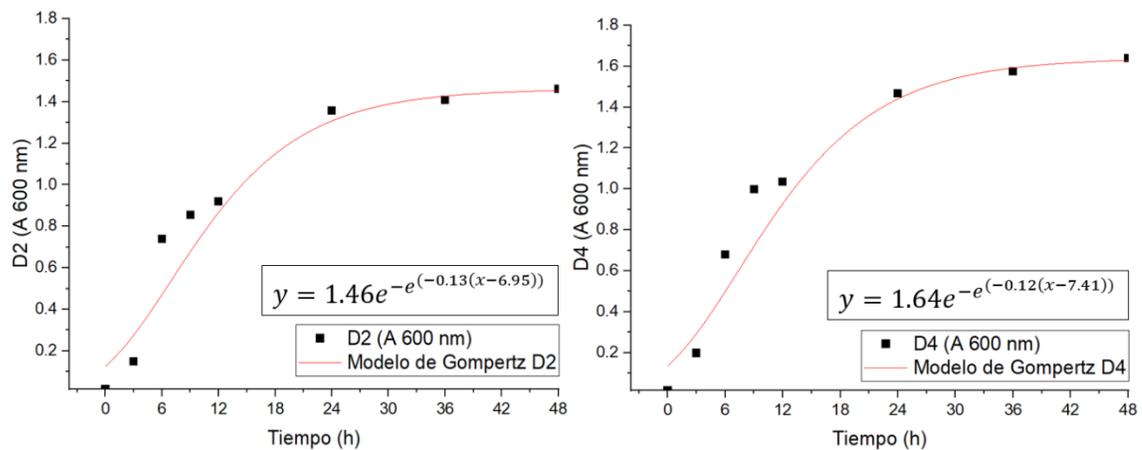


Figura 17. Crecimiento de los tratamientos D2 y D4 ajustados al modelo de Gompertz. Siendo y = Población, a = Capacidad de carga, x = Punto en el tiempo en el que el crecimiento alcanza su máximo, xc = desplazamiento en el eje X y k = tasa de crecimiento.

En la Figura (18), se puede observar que, en la tinción de la izquierda correspondiente al tratamiento en el biorreactor, el cual no presentó actividad antimicrobiana (A), donde se aprecia la formación de endosporas. Por otro lado, en la tinción de la derecha (B), correspondiente a la fermentación del tratamiento D9 Tabla (2), no se observa esporulación en las células, pero se obtiene actividad antimicrobiana contra el microorganismo indicador.

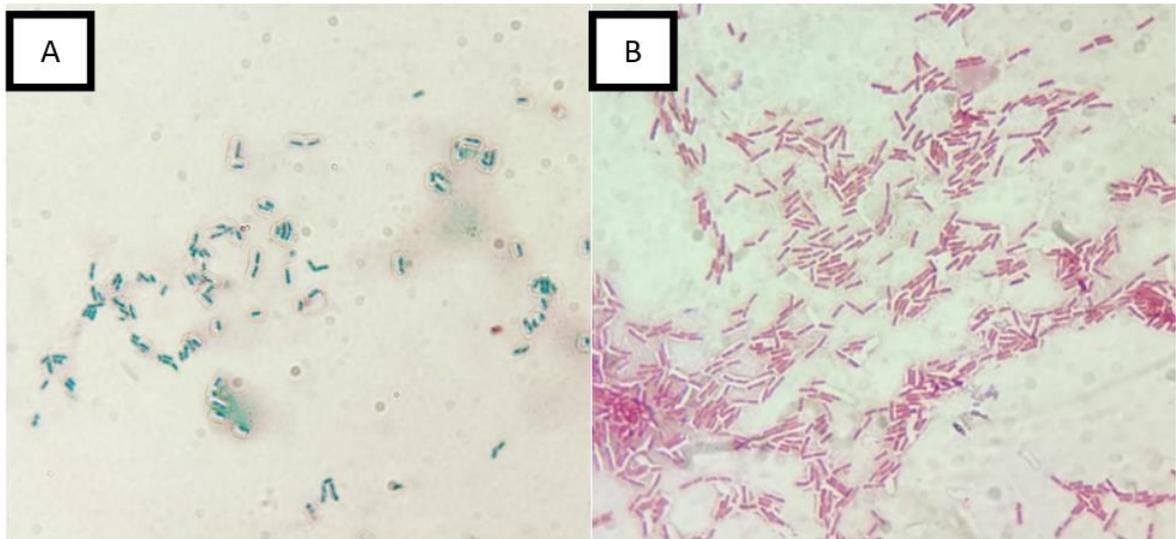


Figura 18. Tinción de esporas con el método de verde de malaquita. (A) Presencia de esporas, (B) células vegetativas. Fotografías representativas de las tinciones de los tratamientos del diseño.

Como se observó en la tinción y correlacionando con la presencia de péptidos antimicrobianos, podemos decir que éstos se producen durante la fase vegetativa de *B. subtilis*, antes de que la bacteria entre en la fase de esporulación. Durante la esporulación, la síntesis de la subtilina se detiene, ya que la energía y los recursos de la célula se desvían hacia la formación de la espora (Zhang et al., 2022).

Se analizó la actividad antimicrobiana en el transcurso de la fermentación. En la Figura (19) se muestra la actividad antimicrobiana obtenida durante la fermentación mediante la formación de halos de inhibición de *M. luteus* NCBI8166, indicando la producción de compuestos antimicrobianos.

El tratamiento con la mayor actividad en actividad antimicrobiana fue el D9, con una inhibición máxima de 24.40 ± 1.13 mm de inhibición a las 48 h, siendo similar estadísticamente al D7, cuyo valor fue de 23.03 ± 0.39 mm de inhibición.

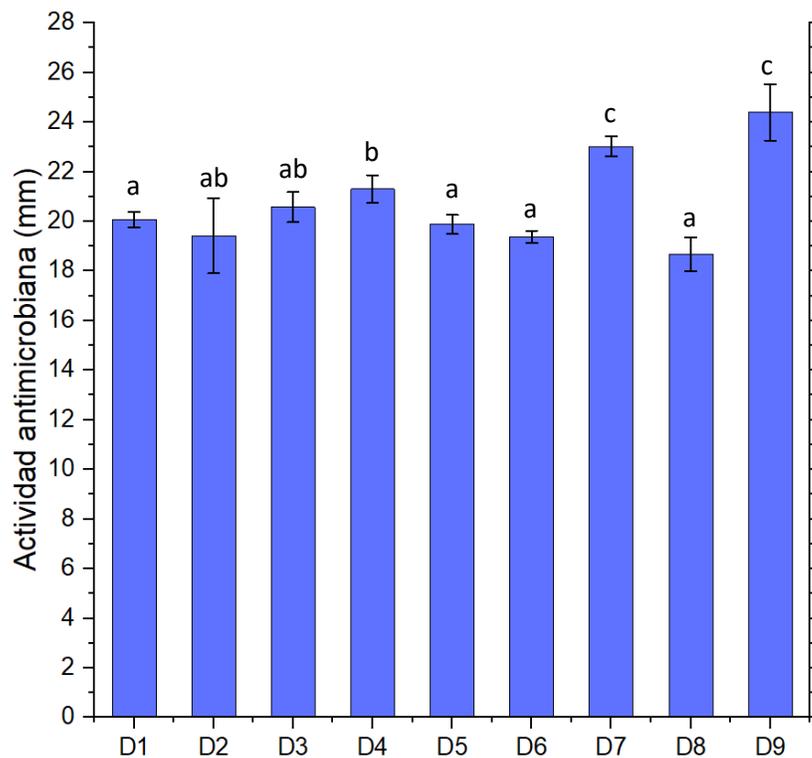


Figura 19. Actividad antimicrobiana a las 48 h de *B. subtilis* ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento, de acuerdo con el diseño experimental (Tabla 2). Se presenta el promedio \pm desviación estándar, n = 3.

Como se muestra en la Tabla (3), el tratamiento D9 presentó 1.77 veces más inhibición que los reportados en Wei et al., 2021 contra *M. luteus* CMCC 28000. Valores inferiores en los halos de inhibición se reportaron cuando se usaron como microorganismos indicadores de la actividad antimicrobiana *M. luteus* NCBI8166 (Ansari et al., 2012) y *Micrococcus* sp. KIBGE IB-20 (Liu et al., 2015).

Tabla 3. Actividad antimicrobiana a las 48 h de las bacteriocinas producidas por cepas de *B. subtilis* contra cepas de *Micrococcus luteus* en diferentes estudios.

Microorganismo evaluado	Microorganismo indicador	Inhibición (mm)	Inicio de actividad	Máxima actividad	Referencia
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>M. luteus</i> NCBI8166	24.40±1.13	24 h	48 h	Presente estudio
<i>B. subtilis</i> KIBGE IB-17	<i>M. luteus</i> KIBGE IB-20	27.0±4.00	6 h	24 h	Ansari et al. (2012)
<i>B. subtilis</i> EMD4	<i>Micrococcus</i> sp. NCBI8166	30.0±1.00	12 h	36 h	Liu et al. (2015)
<i>B. subtilis</i> JS-4	<i>M. luteus</i> CMCC 28000	13.76±0.24	26 h	36 h	Wei et al. (2021)

La variación en la actividad antimicrobiana se puede atribuir a la diferencia en los nutrientes del medio de crecimiento de cada estudio o a la cepa de *Bacillus* evaluada. Helfrich et al. (2022), mencionan que la producción de péptidos antimicrobianos está regulada por la presencia de nutrientes como el extracto de levadura que influye directamente con el crecimiento del microorganismo y otros factores ambientales como la temperatura o pH . Wei et al. (2021), utilizaron caldo Luria Bertani como medio de cultivo de *B. subtilis*, para la producción de metabolitos antimicrobianos, mientras que Liu et al. (2015), usaron caldo soya tripticaseína. Por otro lado, Ansari et al. (2012), trabajaron con 10 g/L de triptona, 5.0 g/L de extracto de levadura y 5.0 g/L de NaCl. Los estudios que aquí se mencionan evaluaron cepas distintas de *B. subtilis*, lo cual influye e la diversidad de resultados.

6.3. Análisis de varianza del diseño experimental 3² para densidad óptica

Para el análisis estadístico se tomaron los niveles del extracto de levadura como valores cuantitativos de 0.0, 0.5 y 1.0 %. Para los niveles de la concentración de la relación de MgSO₄/MnSO₄ se tomaron como valores categóricos de 1, 2 y 3, correspondientes a 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L.

En la Tabla (4), se muestra el análisis de varianza para densidad óptica evaluada con el espectrofotómetro a 600 nm.

Tabla 4. Análisis de varianza para el crecimiento de *B. subtilis*, medido como la densidad óptica (DO₆₀₀).

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Modelo	0.190	6	0.0312	4.857	0.012
Residual	0.072	11	0.006		
Falta de ajuste		0			
Error puro		0			
Total (corr.)	0.262	17			

El estadístico R² indica que el modelo, así ajustado, explica 77.60 % de la variabilidad en densidad óptica. El valor de R² ajustado fue de 61.18 %, y se considera adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes. El error estándar del estimado muestra que la desviación estándar de los residuos fue 0.081. El estadístico de Durbin-Watson (DW), con un valor de 1.827 ($p=0.294$), indica que no existe correlación significativa en el orden en que se presentan los datos.

En la Tabla (5), se muestra el análisis de los efectos de los factores categóricos (B=Relación MgSO₄/MnSO₄ en g/L) y los factores cuantitativos (A=Extracto de levadura expresado en %) para densidad óptica. El estadístico F

pretende determinar si de entre un grupo de variables independientes, al menos una tiene capacidad de explicar una parte significativa de la variación de la variable dependiente. El resultado de su cálculo se compara con el valor crítico de una distribución F con el nivel de confianza del 5%.

Tabla 5. Análisis de efectos de los factores respecto a la densidad óptica a 600 nm.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor F	Valor-<i>p</i>
Extracto de levadura	0.057	1	0.057	8.785	0.013
Relación MgSO₄/MnSO₄	0.081	2	0.041	6.218	0.016
Interacción	0.002	2	0.001	0.195	0.825

Como se muestra en la Figura (20), el análisis de Pareto indica que los efectos principales, pero no sus interacciones tienen influencia significativa en la variable respuesta ($p < 0.05$). Este análisis muestra que tanto el porcentaje de extracto de levadura como la relación MgSO₄/MnSO₄ afectan significativamente la respuesta.

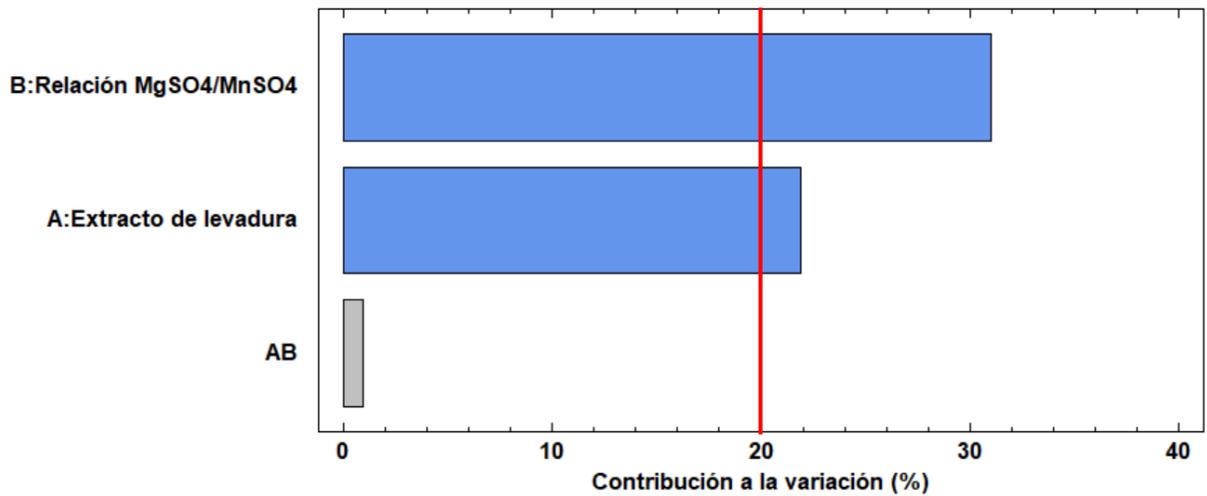


Figura 20. Diagrama de Pareto para densidad óptica. Azul, significativo con $p < 0.05$ y Gris, no significativo.

En la Figura (21), Se observa la gráfica de los efectos principales de los factores sobre el desarrollo de *B. subtilis*. Los resultados indican que el añadir 1 % de extracto de levadura se produce la mayor cantidad de biomasa con un valor de DO_{600} cercano a 1.55 unidades de absorbancia. Para el factor concentración de la relación $MgSO_4/MnSO_4$, el nivel 3 correspondiente a 1.5/0.3, resulta en un mayor nivel de la DO_{600} en comparación con las otras proporciones. Por lo tanto, los niveles de 1.0 % de extracto de levadura y 1.5/0.3 g/L de la concentración de la relación $MgSO_4/MnSO_4$ son los que más favorecen en el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633.

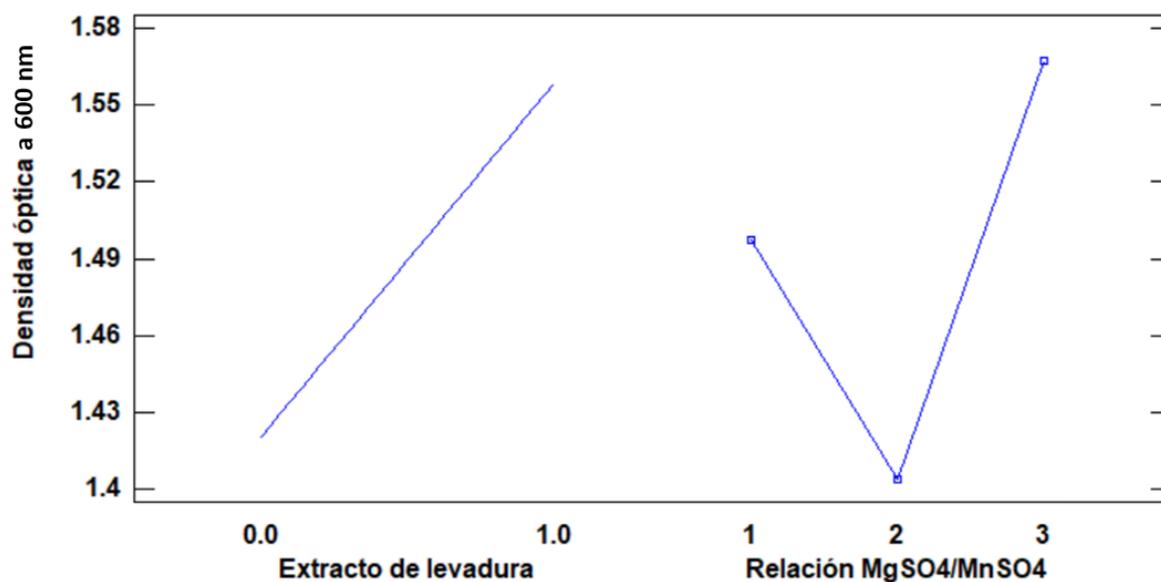


Figura 21. Efectos principales de los factores extracto de levadura 0.0, 0.5 y 1.0 % p/v, la concentración de la relación de MgSO₄/MnSO₄ de 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L sobre la densidad óptica a 600 nm de *B. subtilis* ATCC 6633.

6.4. Análisis estadístico del diseño de experimentos para actividad antimicrobiana

Para el análisis estadístico se tomaron los niveles del extracto de levadura como valores cuantitativos de 0.0, 0.5 y 1.0 %, y para los niveles de la concentración de la relación de MgSO₄/MnSO₄ se tomaron como valores categóricos de 1, 2 y 3, correspondientes a 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L.

En la Tabla (6), se muestra el análisis de varianza para actividad antimicrobiana expresada en mm de diámetro de inhibición.

Tabla 6. Análisis de varianza para la actividad antimicrobiana de *B. subtilis*.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-p
Modelo	44.3075	6	7.38458	4.80942	0.0121
Residual	16.8899	11	1.53544		
Falta de ajuste		0			
Error puro		0			
Total (corr.)	61.1974	17			

El valor de R^2 indica que el modelo explica 72.40 % de la variabilidad en la actividad antimicrobiana. El valor de R^2 ajustada, que es más adecuado para comparar modelos con diferente número de variables independientes, fue de 60.90 %. El estadístico de Durbin-Watson (DW), con valor de 2.808 ($p=0.932$), indica que no hay correlación significativa en el orden en que se presentan los datos.

En la Tabla (7), se muestra el análisis de los efectos de los factores para la actividad antimicrobiana. El valor F indica que solamente la concentración del extracto de levadura es estadísticamente significativo ($p<0.05$), como se ilustra claramente en el diagrama de Pareto, Figura (22).

Tabla 7. Análisis de efectos de factores respecto a la actividad antimicrobiana.

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Valor-F	Valor-p
Extracto de levadura	34.003	1	34.003	22.146	0.000
Relación MgSO₄/MnSO₄	0.102	2	0.051	0.033	0.967
Interacción	10.195	2	5.098	3.320	0.074

El análisis de Pareto indica que solamente el extracto de levadura influye significativamente ($p<0.05$) en la variable respuesta (Figura 22).

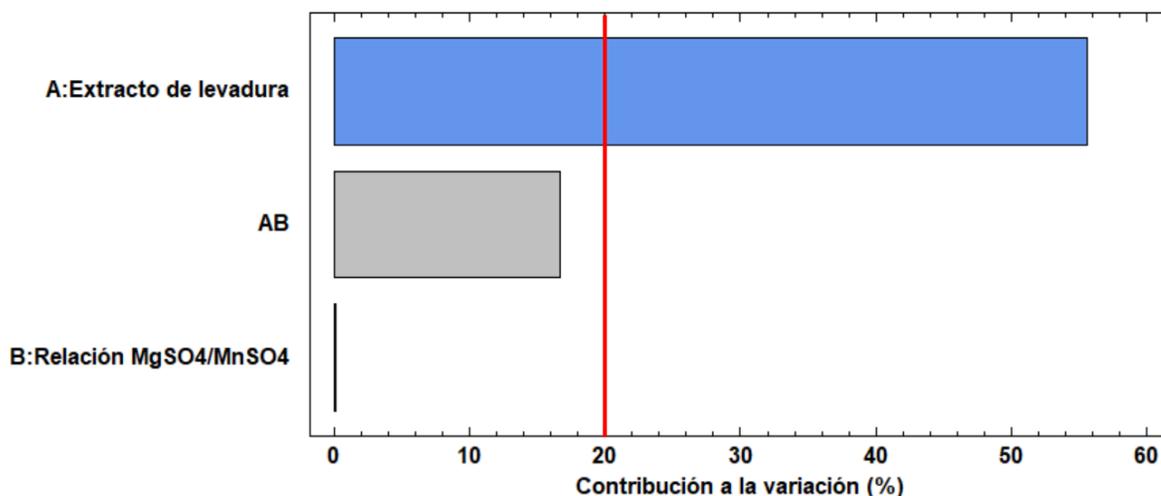


Figura 22. Diagrama de Pareto para actividad antimicrobiana. Azul, significativo con $p < 0.05$ y Gris, no significativo.

Por lo tanto, el nivel de 1.0 % de extracto de levadura favorece significativamente ($p < 0.05$) la actividad antimicrobiana de *B. subtilis* ATCC 6633, Figuras (22 y 23).

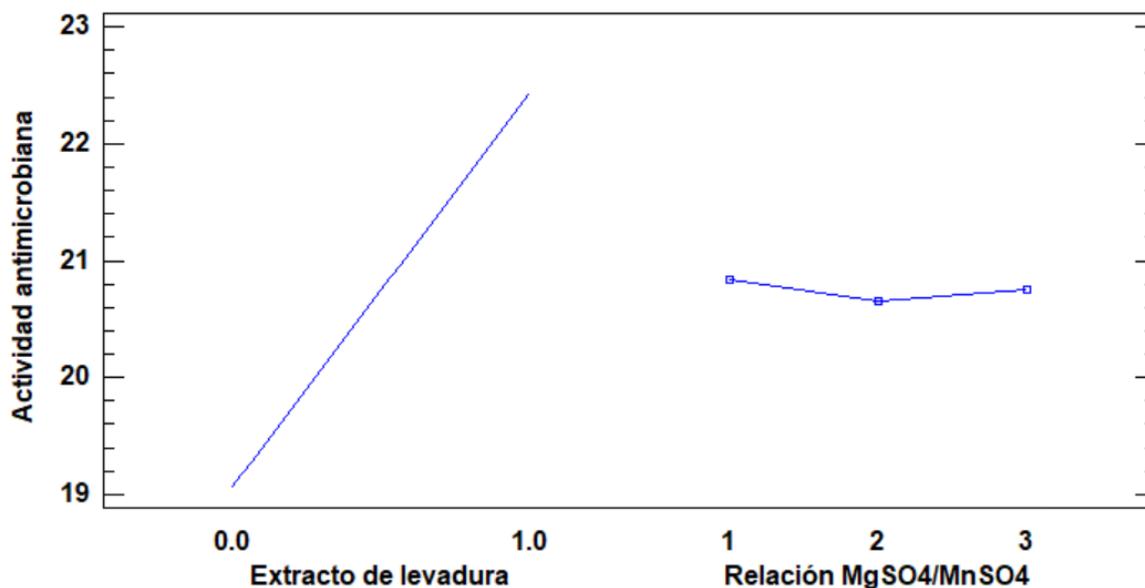


Figura 23. Efectos principales de los factores extracto de levadura 0.0, 0.5 y 1.0 % p/v, la concentración de la relación de MgSO₄/MnSO₄ de 0.5/0.1, 1.0/0.2 y 1.5/0.3 g/L como respuesta la actividad antimicrobiana de *B. subtilis* ATCC 6633 ante *M. luteus*.

6.5. Evaluación del espectro antimicrobiano del extracto de péptidos producido por *B. subtilis* ATCC 6633.

Inicialmente, se realizaron los tratamientos de pre-purificación, como se muestra en la Figura (24), descritos en la metodología para los extractos del tratamiento con 1.0% de extracto de levadura y 0.5/0.1 g/L de MgSO₄/MnSO₄; y del escalamiento en biorreactor con los mismos componentes del medio de cultivo.

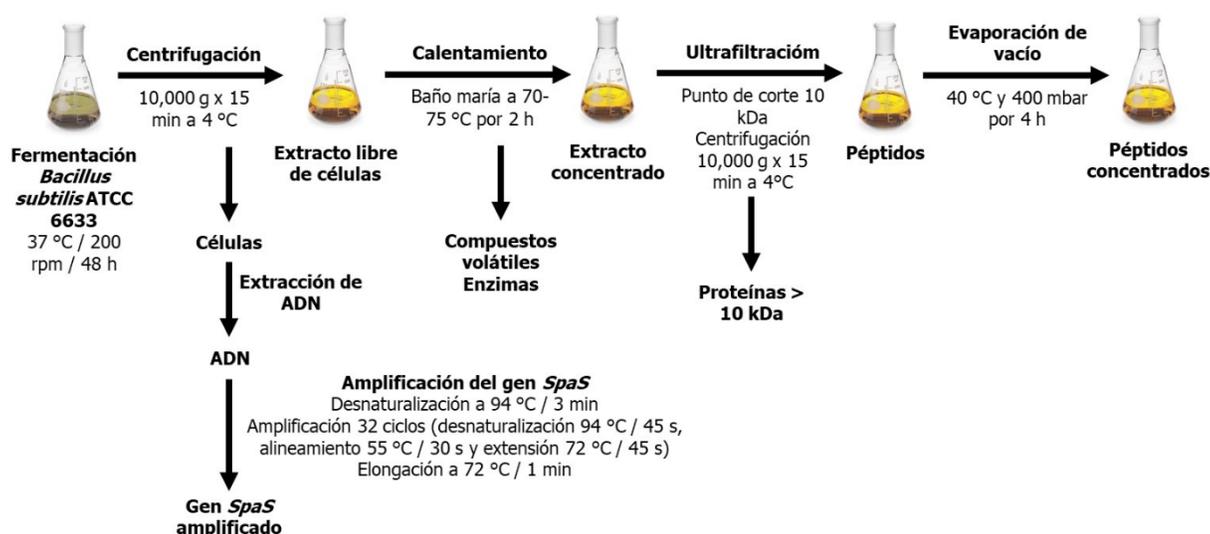


Figura 24. Esquema de pre-purificación y amplificación de ADN del cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633.

El espectro antimicrobiano se determinó mediante el método de difusión en agar y se evaluó la actividad antimicrobiana contra cuatro bacterias Gram-positivas, *S. aureus* 8855, *L. monocytogenes* Scott A, *B. cereus* 1997, *M. luteus* NCBI8166 y una bacteria Gram-negativa, *E. coli*. En la Tabla (8) se muestra la actividad antimicrobiana obtenida con el cultivo de *B. subtilis* del tratamiento D9 (1.0% de extracto de levadura y 0.5/0.1 g/L de MgSO₄/MnSO₄) realizada en matraz agitado, como en biorreactor enriquecido con los mismos componentes, cada uno evaluado en cada etapa de pre-purificación.

Tabla 8. Espectro antimicrobiano de los tratamientos de los extractos en cada paso de pre-purificación de matraz agitado y escalamiento en biorreactor expresado en milímetros (mm).

Cepa indicadora	Matraz agitado				Escalamiento en biorreactor			
	ELC	C	F	E	ELC	C	F	E
<i>S. aureus</i> 8855	0	0	11.30±0.30	14.20±0.40	0	0	0	9.7±0.60
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	0	0	0	10.70±0.20	0	0	0	0
<i>B. cereus</i> 1997	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. luteus</i> NCBI8166	24.40±1.13	26.65±0.70	28.55±0.65	29.35±0.22	21.2±0.42	26.2±0.15	27.9±0.90	28.2±0.46
<i>E. coli</i>	0	0	0	0	0	0	0	0

ELC: extracto libre de células; C: calentamiento a baño maría; F: filtración con membrana; E: evaporación al vacío. Se presenta el promedio±desviación estándar, n = 3.

El extracto en todos los niveles de pre-purificación inhibió a *M. luteus* teniendo valores superiores a los 24 mm de diámetro del halo de inhibición. Se alcanzaron valores cercanos a 30 mm de diámetro del halo de inhibición tanto con el matraz agitado como con el escalamiento en biorreactor. *S. aureus* fue moderadamente inhibida por los extractos en los niveles de filtración (F) y evaporación al vacío (E) del caldo procedente del matraz agitado.

Los diámetros de inhibición fueron similares a los reportados por Qin et al. (2019) y Epparti et al. (2022). Además, el nivel E de pre-purificación del caldo proveniente del biorreactor también mostró inhibición de *S. aureus*, pero con inhibición 32 % menor al obtenido en matraz agitado. Para *L. monocytogenes* se observó un efecto de inhibición moderado y únicamente en el matraz agitado en la etapa E de pre-purificación; sin embargo la inhibición fue 40 % mayor a los diámetros reportados en las investigaciones de Liu et al. (2015).

En el caso de *B. cereus* y *E. coli* no se observó efecto de inhibición en ninguna de las etapas de pre-purificación de los tratamientos. Esto se puede atribuir a que la producción de metabolitos antimicrobianos está relacionada con los componentes del caldo de cultivo, así como con la cepa específica de *Bacillus* sp. (Helfrich et al., 2022). Además, es posible que la concentración de los péptidos

antimicrobianos no sea suficiente para apreciar el efecto inhibitorio por el método de difusión en agar.

6.6. Escalamiento a nivel biorreactor del tratamiento con mayor actividad antimicrobiana

El escalamiento se realizó en el biorreactor instrumentado (Applikon) montado como se muestra en la Figura (25). Para el escalamiento se tomaron las condiciones del tratamiento D9. Se realizaron 3 activaciones de *B. subtilis* ATCC 6633, para las dos primeras se realizaron en 5 mL de caldo soya tripticaseína por 12 h incubando a 37 °C. Después de la segunda activación se inocularon 500 µL del cultivo en 25 mL de caldo soya tripticaseína y se mantuvieron durante 6 h a 200 rpm a 37 °C.



Figura 25. Biorreactor instrumentado Applikon ez-control, modelo Z31011001.

Transcurrido el tiempo se transfirió el 1 % (v/v) de la suspensión, con $DO_{600\text{ nm}} = 1.0$ al biorreactor que contenía 2 L de caldo soya tripticaseína enriquecido con

el extracto de levadura, así como con las sales de $MgSO_4$ y $MnSO_4$ correspondiente al tratamiento seleccionado.

Las condiciones establecidas en el controlador del biorreactor instrumentado fueron $37\text{ }^\circ\text{C}$, pH 7 ajustado automáticamente por el controlador utilizando soluciones de HCl 0.1 M y NaOH 0.1 M. La velocidad de agitación fue de 100 rpm y el flujo de aire constante a $1.0\text{ L aire}/[(\text{min}) (\text{L caldo cultivo})]$ (2.0 vvm). Para el control de nivel de espuma se utilizó una solución de silicón (Antifoam FP) al 0.01% (v/v). Mediante los sensores se tomó cada hora las lecturas del pH, temperatura y oxígeno disuelto, además se tomaron muestras de 15 mL cada hora para determinar parámetros de crecimiento de la bacteria.

En la Figura (26) se muestra el crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633 en biorreactor, el pH registrado por el controlador, la temperatura, oxígeno disuelto y las revoluciones por minuto (rpm).

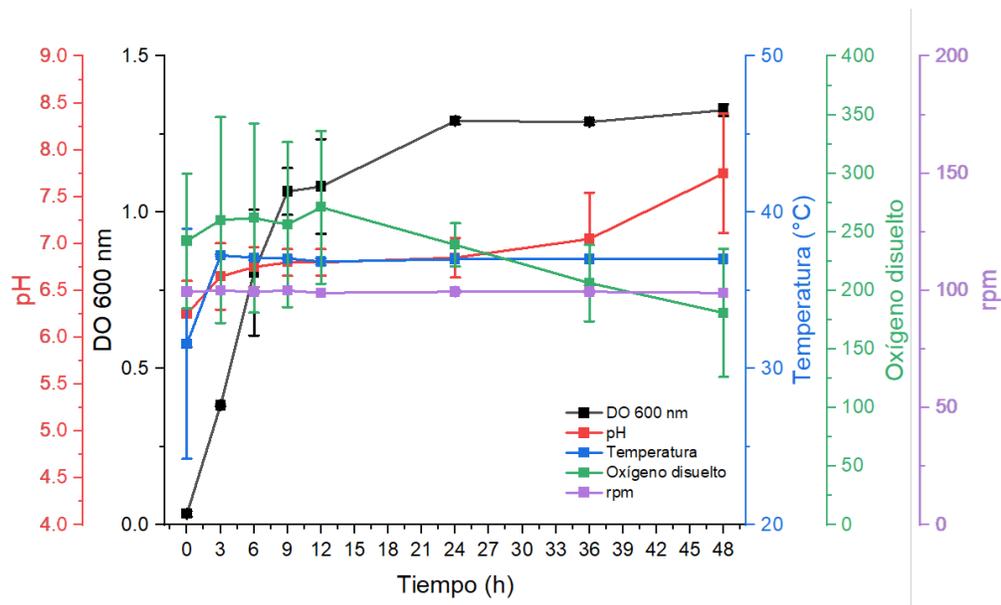


Figura 26. Cinética de crecimiento en biorreactor de *B. subtilis* ATCC 6633, y pH, la temperatura, oxígeno disuelto y la agitación que prevaleció en la cinética. Se presenta el promedio \pm desviación estándar de cada parámetro, $n = 3$.

La actividad antimicrobiana del extracto libre de células a la hora 48, resultó en un halo de inhibición de 21.2 ± 0.42 mm de diámetro. Este halo fue menor que el

obtenido en el tratamiento mediante matraz agitado. Se tienen pocos reportes sobre la producción de subtilina en biorreactor, sin embargo, según Monteiro et al. (2014), este método favorece la formación de esporas. Siendo que la formación de estas esporas no está relacionada con la síntesis de subtilina, esto no es favorable.

6.7. Determinación de la concentración de proteína de los extractos por el método de Bradford

Se utilizó este método para los extractos libre de células, extractos concentrados por calentamiento, filtración por centrifugación con membrana de 10 kDa y evaporación al vacío obtenidos en la fermentación sumergida de *B. subtilis* ATCC 6633 del tratamiento D9 y del escalamiento en biorreactor. Se realizó la construcción de una curva de calibración para la determinación cuantitativa de proteínas utilizando albúmina de suero bovino como estándar de referencia obteniendo una ecuación de la recta, con $R^2 = 0.971$:

$$y = 25.465(\text{Concentración de proteína, } \left(\frac{mg}{mL}\right)) + 0.0452$$

Los resultados obtenidos que se muestran en la Tabla (9) se comparan con la actividad antimicrobiana de los extractos y sus concentrados, tanto del tratamiento con mayor actividad antimicrobiana del diseño experimental como del escalamiento en biorreactor en sus etapas de pre-purificación.

Tabla 9. Comparación de los extractos obtenidos por fermentación en matraz agitado y del biorreactor de cada etapa de prepurificación.

Etapa	Volumen (mL)	Actividad antimicrobiana sobre <i>M. luteus</i> (mm de inhibición)	Proteína total (mg)	Actividad específica (mm/g de proteína)	Factor de purificación*
ELC-M	2000	24.40	14828.20	1.65	1.00
C-M	100	26.65	1591.60	16.74	10.18
F-M	50	28.55	329.47	86.65	52.66
E-M	22	29.35	276.72	106.07	64.46
ELC-B	2000	21.15	9448.26	2.24	1.00
C-B	100	26.20	1397.21	18.75	8.38
F-B	50	27.90	435.50	64.06	28.62
E-B	25	28.20	321.21	87.79	39.22

ELC, extracto libre de células; C, calentamiento a baño maría; F, filtración con membrana; E, evaporación de vacío; M, tratamiento en matraz agitado; B, escalamiento en biorreactor. *Obtenido dividiendo la actividad específica de cada paso de purificación entre la actividad específica del ELC.

Se destaca el tratamiento del matraz agitado en la etapa de evaporación al vacío, logrando un factor de purificación de 64.46, siendo 60% mayor que el obtenido por escalamiento en biorreactor en la misma etapa. El factor de purificación se utilizó para indicar el grado de purificación alcanzado después de cada paso en comparación con la muestra inicial. Por lo general, se expresa como una relación o factor, que representa el enriquecimiento de la proteína (Karagiota et al., 2021).

6.8. Reto de *Staphylococcus aureus* en una matriz alimentaria tratada con los péptidos antimicrobianos obtenidos en la fermentación

Con el fin de evaluar el efecto de inhibición del extracto con los péptidos antimicrobianos se realizaron dos pruebas. En la primera prueba se evaluaron diferentes porcentajes en volumen del extracto más concentrado y con la mayor actividad específica (106.07 mm de inhibición/g de proteína) en caldo soya tripticaseína. La segunda prueba evaluó la actividad antimicrobiana en el alimento. El lomo de cerdo se sometió a tres lavados con etanol al 96 % y un lavado con hipoclorito de sodio a 200 ppm (Filipowska et al., 2017) y se dejó en la campana de flujo laminar hasta la evaporación del etanol, para luego realizar los cortes de carne en el tamaño especificado.

Los resultados de la evaluación del efecto de inhibición de *S. aureus* en caldo soya tripticaseína se muestran en la Figura (27).

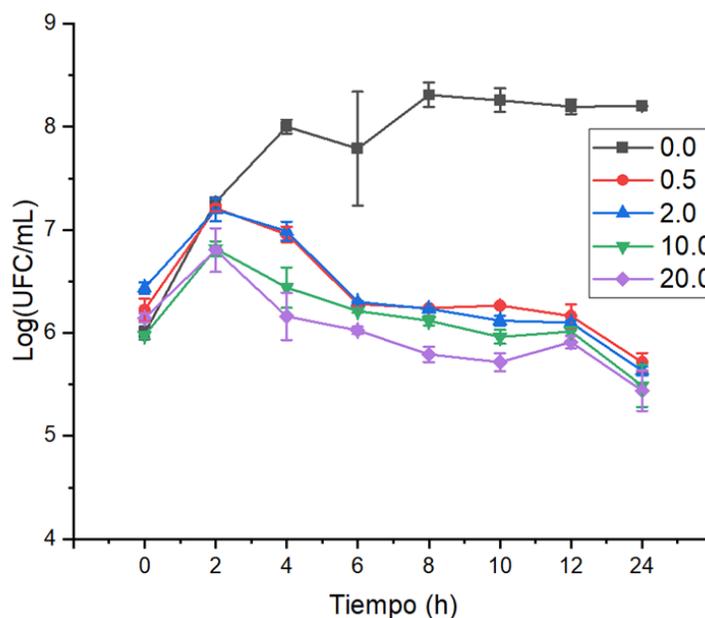


Figura 27. Población de *S. aureus* 8855 en diferentes concentraciones 0.0, 0.5, 2.0, 10.0 y 20.0 % (v/v) del extracto con actividad específica de 106.07 mm/g de proteína, evaluada durante 24 h a 37 °C en caldo soya tripticaseína. Se presenta el promedio \pm desviación estándar, n = 3.

Estos resultados indican un efecto bacteriostático por parte del extracto con una actividad específica de 106.07 mm de inhibición/g de proteína contra *S. aureus*, ya que se inhibió su crecimiento. Sin embargo, se observó una reducción de 2.5 log UFC/mL, respecto al control sin los péptidos antimicrobianos. Durante las primeras dos horas el efecto de la presencia de los péptidos puede ilustrarse con las diferencias en las pendientes del incremento de la población viable. A partir de las 4 horas ya se observa la inhibición del desarrollo con tendencia a la inactivación (efecto bactericida).

Este resultado concuerda con el reporte de Sharma et al. (2009), quienes encontraron un efecto bacteriostático del extracto de la fermentación de *B. subtilis* que ellos obtuvieron contra otra cepa de *S. aureus* IGMC. Al aumentar el porcentaje de extracto no se observa diferencia en el efecto antimicrobiano entre los tratamientos, por lo que independientemente de la concentración del extracto el efecto de inhibición es el mismo.

Posteriormente, con base en los resultados y a la capacidad de absorción de líquidos por la carne, se optó por adicionar 0.2 mL del extracto de péptidos de 106.07 mm de inhibición/g de proteína en la carne. La carne fue empacada al vacío y almacenada a 4 °C Figura (28). Se realizó el recuento de la población de *S. aureus* en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10, utilizando el agar Baird-Parker enriquecido con 1% (v/v) de telurito de potasio.



Figura 28. Muestras de lomo de cerdo con *S. aureus* 8855 tratadas con el extracto E-M.

Los resultados de la evaluación del efecto de inhibición de *S. aureus* 8855 en la matriz alimentaria se muestran en la Figura (29).

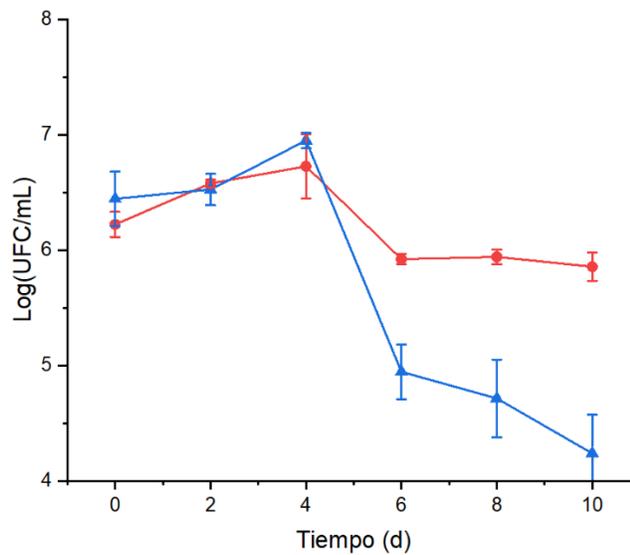


Figura 29. Curva de crecimiento de *S. aureus* 8855, evaluada durante 10 días. (●): en lomo de cerdo. (▲): en el mismo alimento, adicionando 0.2 mL del extracto concentrado (106.07 mm de inhibición/g de proteína). Se presenta el promedio \pm desviación estándar, n = 3.

En la evaluación del crecimiento de *S. aureus* en la matriz alimentaria, usando el extracto E-M, muestra un ligero crecimiento de *S. aureus* 8855 durante 4 días, similar a lo que ocurre con el control. No obstante, a los 10 días de almacenamiento refrigerado, se observó una reducción de la población microbiana de alrededor de 10^2 UFC/mL. Resultados similares fueron obtenidos por Qin et al. (2019), quienes evaluaron el efecto sobre *S. aureus* ATCC 29213 de sus extractos antimicrobianos purificados obtenidos por la fermentación de *B. subtilis* L-Q11 teniendo un efecto bacteriostático. Por otro lado, Xin et al. (2021), observaron una reducción de la población de *S. aureus* De 10^2 UFC/mL, misma que se obtuvo en esta investigación.

La sal ha desempeñado un papel importante en la reducción de la actividad del agua (a_w), lo que la convierte en una herramienta utilizada para prevenir el deterioro y el crecimiento bacteriano en los alimentos. De esta manera, los alimentos con bajos niveles de a_w pueden mantenerse usando tratamientos térmicos suaves o incluso sin necesidad de ellos. Sin embargo, algunas bacterias patógenas como *S. aureus* y *L. monocytogenes* pueden sobrevivir en ambientes con alta concentración de sal del 10 % p/v o incluso más altas, lo que puede ocasionar enfermedades transmitidas por los alimentos (Carhuallanqui-Pérez et al., 2020). En particular, *S. aureus* tiene la capacidad de crecer en concentraciones de 10^5 - 10^6 UFC/mL y producir toxinas en alimentos aún en con niveles de a_w tan bajos como 0.85, e incluso puede desarrollarse en presencia de hasta un 25 % p/v de NaCl (Hurtado et al., 2002). Además, *S. aureus* se reconoce como un agente común de intoxicación alimentaria, debido a que se encuentra presente en los seres humanos y animales como bacteria comensal, y por su capacidad para producir toxinas resistentes al calor y al ácido. Por lo tanto, *S. aureus* se utiliza como uno de los indicadores para controlar las condiciones de higiene en la producción de alimentos (Chhetri et al., 2019).

Por lo anterior, el lograr una reducción de 10^2 UFC/mL puede significar el evitar la síntesis de toxinas de *S. aureus* y por tanto, no presentar efectos adversos

a la salud. Para su óptimo crecimiento requiere nutrientes como carbohidratos, fuentes de nitrógeno y factores de crecimiento para producir toxinas y como ya se mencionó, una población de 10^5 - 10^6 UFC/mL. Una temperatura de alrededor de 37 °C y un pH ligeramente ácido (alrededor de 5.5-6.0) puede aumentar la producción de enterotoxinas. La regulación genética y los mecanismos de virulencia también son importantes para la producción de estas toxinas (Cervantes-García et al., 2014).

6.9. Identificación del gen estructural *SpaS* de la subtilina

Se realizó la extracción de ADN del cultivo de *B. subtilis* usando el protocolo del kit PowerSoil® DNA Isolation (MO BIO, San Mateo, CA, EUA), como se muestra en la Figura (30).

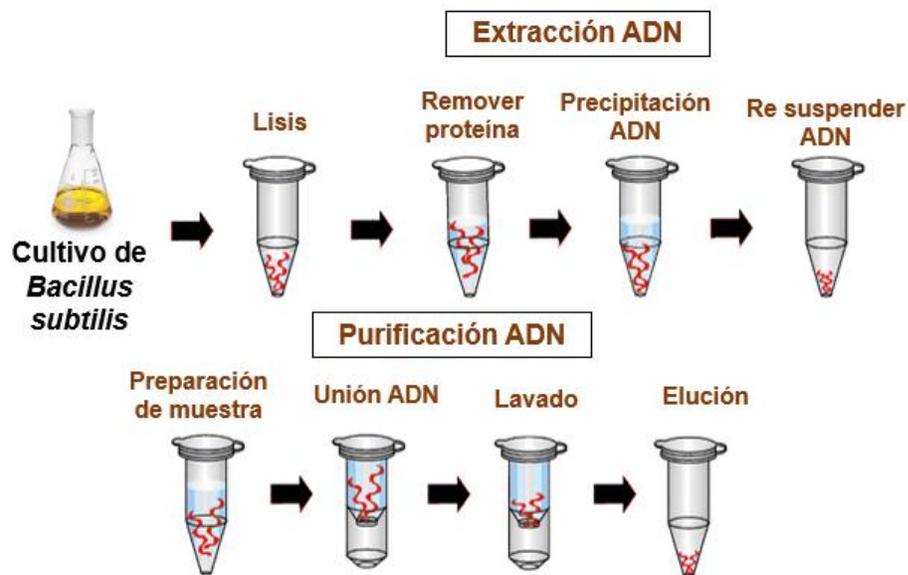


Figura 30. Esquema de extracción y purificación de ADN obtenido de un cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633.

Se midió la concentración y pureza del ADN con un espectrofotómetro NanoDrop siendo de 38.7 ng/μL y una relación de 260/280 de 1.74, respectivamente. También se evaluó la calidad e integridad del ADN realizando una electroforesis con gel de agarosa al 1%.

Se diseñaron los cebadores usados para amplificar fragmentos de 566 pb correspondientes al gen *spaS* de la subtilina producida por *B. subtilis*.

Estos cebadores cumplen con las siguientes especificaciones:

- Carácter único: No hay sitios de unión al ADN molde en la región de amplificación.
- Tamaño: 25 pares de base para forward y reverse.
- Composición de bases: %GC de 52% para forward y reverse, evitando regiones ricas en (A+T) y (C+G).
- Evitar tener más de 3 bases GC en los extremos del oligonucleótido: Ambos cebadores tienen 2 bases GC en los extremos.
- Temperatura media (T_m): 59.3 °C para forward y reverse.
- Diferencia de T_m : Menor a 2 o 3 unidades.
- Estructuras secundarias: Se ha minimizado el efecto de las estructuras secundarias mediante el ajuste de las especificaciones de T_m y %GC.

Se llevaron a cabo tres reacciones de PCR, en las cuales se varió el volumen de $MgCl_2$ [50 mM], utilizando 3 μ L, 4 μ L y 5 μ L, correspondientes a los carriles 2, 3 y 4 de la electroforesis. Cada reacción se realizó con los siguientes componentes: 5 μ L de amortiguador 10X, 3 μ L de $MgCl_2$ [50 mM], 8 μ L de dNTPs [2.5 mM], 0.25 μ L de Taq polimerasa [5 U/mL; Invitrogen], 4 μ L del primer SpaS-f [10 pM/ μ L], 4 μ L del primer SpaS-r [10 pM/ μ L], 5 μ L de la extracción de ADN y 25 μ L de H₂O grado HPLC estéril. Además, se incluyó un blanco sin enzima Taq polimerasa en el experimento ubicado en el carril 4 de la electroforesis.

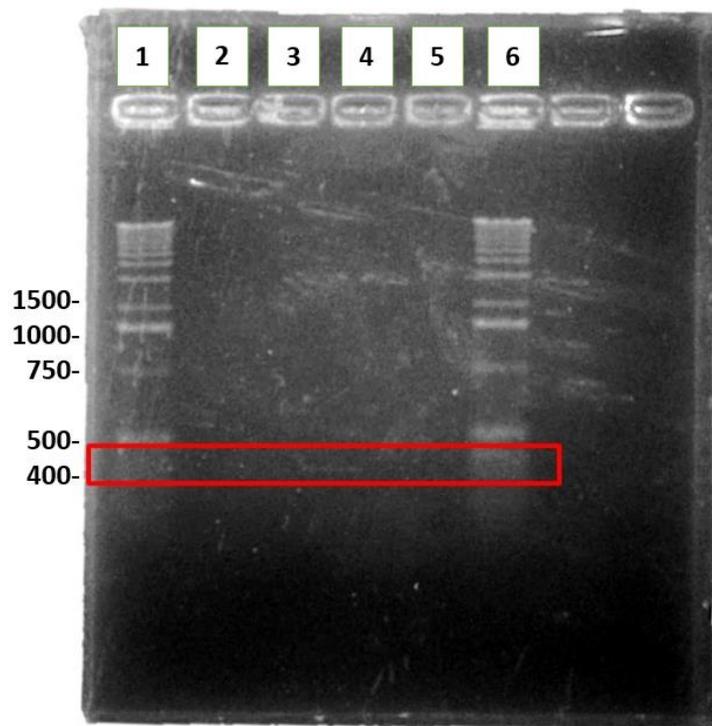


Figura 31. Electroforesis de la amplificación del gen estructural de la subtilina *SpaS*, carriles 1 y 6: marcadores de pares de bases (Bio-Rad, 1 kb), carriles 2-4 gen amplificado y carril 5 blanco son enzima Taq polimerasa.

La cepa mostró una banda positiva con un tamaño que entre 400 y 500 pb después de la electroforesis como se muestra en la Figura (31). Datos similares fueron encontrados en estudios anteriores de Velho et al., (2013). Estos resultados confirmaron la presencia del gen estructural para la síntesis de la subtilina (*SpaS*).

Este resultado demuestra la presencia de uno de los genes asociados a la producción de bacteriocina (*SpaS*) en la cepa de *B. subtilis*. Esto podría explicar la actividad biológica de sus productos de fermentación contra las bacterias Gram-positivas evaluadas (Dabiré et al., 2021). Utilizando los mismos cebadores del gen estructural de subtilina *SpaS*, resultados similares fueron reportados por Velho et al. (2013). Además, varios estudios han reportado la producción de subtilina por muchas subespecies de *B. subtilis* (Stein et al., 2004).

Sin embargo, puede haber efectos combinados con otros péptidos y agentes antimicrobianos que posiblemente estén presentes como la Ericina A o la Ericina S Figura (32), siendo estas bacteriocinas estructuralmente similares a la subtilina y que tienen el mismo efecto y mecanismo antimicrobiano (Caulier et al., 2019; Mercado & Olmos, 2022a). Es importante tener en cuenta que la interacción entre diferentes compuestos antimicrobianos puede ser compleja y variar dependiendo de las condiciones específicas.

Subtilina	---MSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESLCTPGCVTGALQTCFLQTLTCNCKISK-
Ericina A	MTNMSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQVLSKSLCTPGCITGPLQTCYL----CFPTFAKC
Ericina S	---MSKFDDFDLDVVKVSKQDSKITPQWKSESVCTPGCVTGVLQTCFLQTITCNCHISK-

Figura 32. Alineación de bacteriocinas de clase I publicadas de *Bacillus* spp. Las alineaciones se obtuvieron con SnapGene V4.2.6 con la configuración predeterminada.

7. CONCLUSIONES

El caldo soya tripticaseína adicionado con 1% de extracto de levadura conduce a un mayor crecimiento de *B. subtilis* ATCC 6633, así como una mayor actividad antimicrobiana. La actividad antimicrobiana fue mayormente producida en cultivo agitado, ya que en biorreactor la tendencia fue la formación de esporas por parte de la bacteria.

El espectro antimicrobiano del extracto inhibió las bacterias Gram-positivas *M. luteus*, *L. monocytogenes* y *S. aureus*.

El extracto obtenido durante la fermentación fue capaz de inhibir el crecimiento de *S. aureus* en lomo de cerdo (*Longissimus dorsi*). La amplificación e identificación del gen estructural *SpaS*, evidenciaron la presencia de subtilina producida por *B. subtilis* ATCC 6633.

Las condiciones de fermentación deben estudiarse considerando otros factores o sustratos, con el fin de optimizar la producción de los compuestos antimicrobianos. Debe evaluarse la seguridad y la estabilidad de estos compuestos antimicrobianos, así como su espectro de actividad, para lograr su aplicación en la conservación de alimentos.

8. REFERENCIAS

- Abriouel, H., Franz, C. M. A. P., Omar, N. B., & Gálvez, A. (2011). Diversity and applications of *Bacillus* bacteriocins. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(1), 201-232. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00244.x>
- Ansari, A., Aman, A., Siddiqui, N. N., Iqbal, S., & Qader, S. A. (2012). Bacteriocin (BAC-IB17): Screening, isolation and production from *B. subtilis* KIBGE IB-17. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 25, 195-201.
- Arnaouteli, S., Bamford, N. C., Stanley-Wall, N. R., & Kovács, Á. T. (2021). *B. subtilis* biofilm formation and social interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 19(9), 600-614. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00540-9>
- Balciunas, E. M., Castillo Martinez, F. A., Todorov, S. D., Franco, B. D. G. de M., Converti, A., & Oliveira, R. P. de S. (2013). Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. *Food Control*, 32(1), 134-142. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>
- Balleza, D., Alessandrini, A., & Beltrán García, M. J. (2019). Role of lipid composition, physicochemical interactions, and membrane mechanics in the molecular actions of microbial cyclic lipopeptides. *The Journal of Membrane Biology*, 252(2-3), 131-157. <https://doi.org/10.1007/s00232-019-00067-4>
- Barbieri, G., Albertini, A. M., Ferrari, E., Sonenshein, A. L., & Belitsky, B. R. (2016). Interplay of CodY and ScoC in the Regulation of Major Extracellular Protease Genes of *B. subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 198(6), 907-920. <https://doi.org/10.1128/jb.00894-15>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Burg, M. J. G., Pulido, R. P., Antonio, Lucas, R., & Gálvez, A. (2017). Bioconservación de alimentos lácteos. *Anales de la Real Academia de Ciencias Veterinarias de Andalucía Oriental*, 30, 193-204.
- Candia-Sanchez, L. F., Álvarez-Cervantes, J., Díaz, R., & Díaz-Godínez, G. (2017). Uso potencial de biorreactores para la producción de lacasas de hongos basidiomicetos.

Mexican Journal of Biotechnology, 2(1), 15-36.
<https://doi.org/10.29267/mxjb.2017.2.1.15>

- Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., Ramos Delgado, D., Carhuallanqui Pérez, A., Salazar Salvatierra, M. E., & Ramos Delgado, D. (2020). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de Orégano frente a *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus*. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(1), 25-33. <https://doi.org/10.18271/ria.2020.530>
- Caulier, S., Nannan, C., Gillis, A., Licciardi, F., Bragard, C., & Mahillon, J. (2019). Overview of the antimicrobial compounds produced by members of the *B. subtilis* group. *Frontiers in Microbiology*, 10, 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00302>
- Cawoy, H., Mariutto, M., Henry, G., Fisher, C., Vasilyeva, N., Thonart, P., Dommes, J., & Ongena, M. (2014). Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(2), 87-100. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0262-R>
- Cervantes-García, E., García-González, R., & Salazar-Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
- Chen, H. C., & Hoover, D. G. (2003). Bacteriocins and their food applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(3), 82-100. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00016.x>
- Chhetri, V., Prakitchaiwattana, C., & Settachaimongkon, S. (2019). A potential protective culture; halophilic *Bacillus* isolates with bacteriocin encoding gene against *Staphylococcus aureus* in salt added foods. *Food Control*, 104, 292-299. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.043>
- Dabiré, Y., Somda, N. S., Compaoré, C. S., Mogmenga, I., Somda, M. K., Ouattara, A. S., Dicko, M. H., Ugwuanyi, J. O., Ezeogu, L. I., & Traoré, A. S. (2021). Molecular screening of bacteriocin-producing *Bacillus* spp. isolated from Soumbala, a fermented food condiment from *Parkia biglobosa* seeds. *Scientific African*, 12, e00836. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2021.e00836>

- Deleu, M., Paquot, M., & Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air–aqueous interface—Implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 283(2), 358-365. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.09.036>
- Epparti, P., Eligar, S. M., Sattur, A. P., Gnanesh Kumar, B. S., & Halami, P. M. (2022). Characterization of dual bacteriocins producing *B. subtilis* SC3.7 isolated from fermented food. *Food Science and Technology*, 154, 112854. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112854>
- Farace, G., Fernandez, O., Jacquens, L., Coutte, F., Krier, F., Jacques, P., Clément, C., Barka, E. A., Jacquard, C., & Dorey, S. (2015). Cyclic lipopeptides from *B. subtilis* activate distinct patterns of defence responses in grapevine: Cyclic lipopeptides in grapevine innate immunity. *Molecular Plant Pathology*, 16(2), 177-187. <https://doi.org/10.1111/mpp.12170>
- Fazenda, M. L., Seviour, R., McNeil, B., & Harvey, L. M. (2008). Submerged culture fermentation of “Higher fungi”: The macrofungi. En *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 63, pp. 33-103). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(07\)00002-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(07)00002-0)
- Filipowska, J., Cholewa-Kowalska, K., Wieczorek, J., Semik, D., Dąbrowski, Z., Łączka, M., & Osyczka, A. M. (2017). Ectopic bone formation by gel-derived bioactive glass-poly-L-lactide-co-glycolide composites in a rabbit muscle model. *Biomedical Materials*, 12(1), 015015. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa4eb7>
- Gómez, A. C. A., & Araujo-Burgos, T. (2021). Frecuencia de aditivos alimentarios en productos cárnicos procesados bolivianos expedidos en la ciudad de Cochabamba, Bolivia. *Journal Boliviano de Ciencias*, 17(Especial), Article Especial. <https://doi.org/10.52428/20758944.v17iEspecial.4>
- Halami, P. M. (2019). Sublichenin, a new subtilin-like lantibiotics of probiotic bacterium *Bacillus licheniformis* MCC 2512T with antibacterial activity. *Microbial Pathogenesis*, 128, 139-146. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.12.044>

- Hassan, M. A., El-Naggar, M. Y., & Said, W. Y. (2001). Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. *Egyptian Journal of Biology*, 3(1), 1-10.
- Helfrich, M., Entian, K.-D., & Stein, T. (2022). Antibiotic profiling of wild-type bacilli led to the discovery of new lanthipeptide subtilin-producing *Bacillus spizizenii* strains whose 16S rDNA sequences differ from the *B. spizizenii* typing strain. *International Microbiology*, 25(4), 839-850. <https://doi.org/10.1007/s10123-022-00266-5>
- Heredia-Castro, P. Y., Hernández-Mendoza, A., González-Córdova, A. F., & Vallejo-Cordoba, B. (2017). Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: Mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia*, 42(6), 340-346.
- Hernández-Hernández, E., Lira-Moreno, C. Y., Guerrero-Legarreta, I., Wild-Padua, G., Di Pierro, P., García-Almendárez, B. E., & Regalado-González, C. (2017). Effect of nanoemulsified and microencapsulated mexican oregano (*Lippia graveolens* Kunth) essential oil coatings on quality of fresh pork meat. *Journal of Food Science*, 82(6), 1423-1432. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13728>
- Hurtado, M. P., de la Parte, M. A., & Brito, A. (2002). *Staphylococcus aureus*: Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 22(2), 112-118.
- Islam, R., Hossain, M. N., Alam, M. K., Uddin, M. E., Rony, M. H., Imran, M. A. S., & Alam, M. F. (2020). Antibacterial activity of lactic acid bacteria and extraction of bacteriocin protein. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 11(2), Article 2. <https://doi.org/10.4236/abb.2020.112004>
- Johnson, E. M., Jung, Dr. Y.-G., Jin, Dr. Y.-Y., Jayabalan, Dr. R., Yang, Dr. S. H., & Suh, J. W. (2018). Bacteriocins as food preservatives: Challenges and emerging horizons. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(16), 2743-2767. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1340870>
- Jourdan, E., Henry, G., Duby, F., Dommès, J., Barthélemy, J. P., Thonart, P., & Ongena, M. (2009). Insights into the defense-related events occurring in plant cells following

- perception of surfactin-type lipopeptide from *B. subtilis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22(4), 456-468. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-4-0456>
- Karagiota, A., Tsitsopoulou, H., Tasakis, R. N., Zoumpourtikoudi, V., & Touraki, M. (2021). Characterization and quantitative determination of a diverse group of *B. subtilis* subsp. *subtilis* NCIB 3610 antibacterial peptides. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 13(2), 555-570. <https://doi.org/10.1007/s12602-020-09706-y>
- Keymanesh, K., Soltani, S., & Sardari, S. (2009). Application of antimicrobial peptides in agriculture and food industry. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6), 933-944. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9984-7>
- Khanna, K., Lopez-Garrido, J., Sugie, J., Pogliano, K., & Villa, E. (2021). Asymmetric localization of the cell division machinery during *B. subtilis* sporulation. *ELife*, 10, e62204. <https://doi.org/10.7554/eLife.62204>
- Kleerebezem, M., Bongers, R., Rutten, G., Vos, W. M. de, & Kuipers, O. P. (2004). Autoregulation of subtilin biosynthesis in *B. subtilis*: The role of the spa-box in subtilin-responsive promoters. *Peptides*, 25(9), 1415-1424. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.025>
- Kovács, Á. T. (2019). *B. subtilis*. *Trends in Microbiology*, 27(8), 724-725. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.03.008>
- Lee, H., & Kim, H.-Y. (2011). Lantibiotics, class I bacteriocins from the genus *Bacillus*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(3). <https://doi.org/10.4014/jmb.1010.10017>
- Liu, X., Lee, J. Y., Jeong, S.-J., Cho, K. M., Kim, G. M., Shin, J.-H., & Kim, J.-S. K. and J. H. (2015). Properties of a bacteriocin produced by *B. subtilis* EMD4 isolated from Ganjang (Soy Sauce). *Korean Society for Microbiology and Biotechnology*, 25(9), 1493-1501. <https://doi.org/10.4014/jmb.1502.02037>
- Mercado, V., & Olmos, J. (2022a). Bacteriocin production by *Bacillus* species: Isolation, characterization, and application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09966-w>

- Mercado, V., & Olmos, J. (2022b). Bacteriocin production by *Bacillus Species*: Isolation, characterization, and application. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. <https://doi.org/10.1007/s12602-022-09966-w>
- Monteiro, S. M. S., Clemente, J. J., Carrondo, M. J. T., & Cunha, A. E. (2014). Enhanced spore production of *B. subtilis* grown in a chemically defined medium. *Advances in Microbiology*, 04(08), Article 08. <https://doi.org/10.4236/aim.2014.48049>
- Nath, S., Chowdhury, S., & Dora, K. C. (2015). Application of *Bacillus sp.* as a biopreservative for food preservation. *Journal of Engineering Research and Applications*, 5(4), 11.
- Nikiforova, O. A., Klykov, S., Volski, A., Dicks, L. M. T., & Chikindas, M. L. (2016). Subtilosin A production by *B. subtilis* KATMIRA1933 and colony morphology are influenced by the growth medium. *Annals of Microbiology*, 66(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1149-3>
- O'Connor, P. M., Kuniyoshi, T. M., Oliveira, R. P., Hill, C., Ross, R. P., & Cotter, P. D. (2020). Antimicrobials for food and feed; a bacteriocin perspective. *Current Opinion in Biotechnology*, 61, 160-167. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.12.023>
- Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.-L., & Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *B. subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environmental Microbiology*, 9(4), 1084-1090. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01202.x>
- Peleg, M., & Corradini, M. G. (2011). Microbial Growth Curves: What the Models Tell Us and What They Cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(10), 917-945. <https://doi.org/10.1080/10408398.2011.570463>
- Priest, F. G. (2014). Systematics and ecology of *Bacillus*. En A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, & R. Losick (Eds.), *B. subtilis and Other Gram-Positive Bacteria* (pp. 1-16). ASM Press. <https://doi.org/10.1128/9781555818388.ch1>
- Qin, Y., Wang, Y., He, Y., Zhang, Y., She, Q., Chai, Y., Li, P., & Shang, Q. (2019). Characterization of subtilin L-Q11, a novel class I bacteriocin synthesized by *B. subtilis* L-Q11 isolated from orchard soil. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00484>

- Sahoo, K. K., Arakha, M., Sarkar, P., P, R. D., & Jha, S. (2016). Enhancement of properties of recycled coarse aggregate concrete using bacteria. *International Journal of Smart and Nano Materials*, 7(1), 22-38. <https://doi.org/10.1080/19475411.2016.1152322>
- Shafi, J., Tian, H., & Ji, M. (2017). *Bacillus* species as versatile weapons for plant pathogens: A review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 31(3), 446-459. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1286950>
- Sheu, T.-Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microencapsulation. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1902-1907. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77523-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77523-2)
- Simons, A., Alhanout, K., & Duval, R. E. (2020). Bacteriocins, antimicrobial peptides from bacterial origin: Overview of their biology and their impact against multidrug-resistant bacteria. *Microorganisms*, 8(5), Article 5. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050639>
- Smith, J. E. (2009). *Biotechnology*. Cambridge University Press.
- Stein, T. (2005). *B. subtilis* antibiotics: Structures, syntheses, and specific functions. *Molecular Microbiology*, 56(4), 845-857. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04587.x>
- Stein, T., Borchert, S., Kiesau, P., Heinzmann, S., Klöss, S., Klein, C., Helfrich, M., & Entian, K.-D. (2002). Dual control of subtilin biosynthesis and immunity in *B. subtilis*. *Molecular Microbiology*, 44(2), 403-416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02869.x>
- Stein, T., Düsterhus, S., Stroh, A., & Entian, K.-D. (2004). Subtilosin production by two *B. subtilis* subspecies and variance of the sbo-alb cluster. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4), 2349-2353. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.4.2349-2353.2004>
- Subramaniyam, R., & Vimala, R. (2012). Solid state and submerged fermentation for the production of bioactive substances: A comparative study. *International Journal of Science and Nature*, 3, 480-486.
- Tjørve, K. M. C., & Tjørve, E. (2017). The use of Gompertz models in growth analyses, and new Gompertz-model approach: An addition to the Unified-Richards family. *PLOS ONE*, 12(6), e0178691. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178691>

- Todorov, S. D., Oliveira, R., & Vaz-Velho, M. (2012). Media Optimization of Bacteriocin ST22Ch Production by *Lactobacillus sakei* ST22Ch Isolated from Salpicão, a Traditional Meat-Product from Portugal. *Chemical Engineering Transactions*, 27, 283-288. <https://doi.org/10.3303/CET1227048>
- van Tilburg, A. Y., van Heel, A. J., Stülke, J., de Kok, N. A. W., Rueff, A.-S., & Kuipers, O. P. (2020). Mini*Bacillus* PG10 as a convenient and effective production host for lantibiotics. *ACS Synthetic Biology*, 9(7), 1833-1842. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00194>
- Vasudeva, R. S., Jain, A. C., & Nema, K. G. (1952). Investigations of the inhibitory action of *B. subtilis* on *Fusarium udum* butl., the fungus causing wilt of Pigeon-Pea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Annals of Applied Biology*, 39(2), 229-238. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1952.tb00902.x>
- Vázquez, C., Martín, A., Silóniz, M. I. de, & Serrano, S. (2011). Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *REDUCA (Biología)*, 3(5), Article 5. <http://revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/819>
- Velho, R. V., Basso, A. P., Segalin, J., Costa-Medina, L. F., & Brandelli, A. (2013). The presence of *sboA* and *spaS* genes and antimicrobial peptides subtilosin A and subtilin among *Bacillus* strains of the Amazon basin. *Genetics and Molecular Biology*, 36, 101-104. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013000100014>
- Verma, D. K., Thakur, M., Singh, S., Tripathy, S., Gupta, A. K., Baranwal, D., Patel, A. R., Shah, N., Utama, G. L., Niamah, A. K., Chávez-González, M. L., Gallegos, C. F., Aguilar, C. N., & Srivastav, P. P. (2022). Bacteriocins as antimicrobial and preservative agents in food: Biosynthesis, separation and application. *Food Bioscience*, 46, 101594. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101594>
- Villarreal-Delgado, M. F., Villa-Rodríguez, E. D., Cira-Chávez, L. A., Estrada-Alvarado, M. I., Parra-Cota, F. I., & De los Santos-Villalobos, S. (2018). El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 36(1). <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>

- Wei, Z., Shan, C., Zhang, L., Ge, D., Wang, Y., Xia, X., Liu, X., & Zhou, J. (2021). A novel subtilin-like lantibiotics subtilin JS-4 produced by *B. subtilis* JS-4, and its antibacterial mechanism against *Listeria monocytogenes*. *Food Science and Technology*, *142*, 110993. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.110993>
- Xin, B., Xu, H., Liu, H., Liu, S., Wang, J., Xue, J., Zhang, F., Deng, S., Zeng, H., Zeng, X., Xu, D., Zhao, Y., Li, F., & Wang, G. (2021a). Identification and characterization of a novel circular bacteriocin, bacicyclicin XIN-1, from *Bacillus* sp. Xin1. *Food Control*, *121*, 107696. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107696>
- Xin, B., Xu, H., Liu, H., Liu, S., Wang, J., Xue, J., Zhang, F., Deng, S., Zeng, H., Zeng, X., Xu, D., Zhao, Y., Li, F., & Wang, G. (2021b). Identification and characterization of a novel circular bacteriocin, bacicyclicin XIN-1, from *Bacillus* sp. Xin1. *Food Control*, *121*, 107696. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107696>
- Xu, C., Fu, Y., Liu, F., Liu, Z., Ma, J., Jiang, R., Song, C., Jiang, Z., & Hou, J. (2021). Purification and antimicrobial mechanism of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus rhamnosus* 1.0320. *Food Science and Technology*, *137*, 110338. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110338>
- Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S., & Walker, B. (2018). Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria. *AMB Express*, *8*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13568-018-0536-0>
- Yao, Z., Meng, Y., Le Huong, G., Kim, J., & Kim, J. (2019). Isolation of *B. subtilis* SJ4 from Saeu (Shrimp) Jeotgal, a Korean fermented seafood, and its fibrinolytic activity. *Microbiology and Biotechnology Letters*, *47*, 522-529. <https://doi.org/10.4014/mbl.1906.06003>
- Zhang, J. N., Mazni, A. Z., Chee, K. L., & Joo, S. T. (2020). Application of bacteriocins in food preservation and infectious disease treatment for humans and livestock: A review. *RSC Advances*, *10*(64), 38937-38964. <https://doi.org/10.1039/D0RA06161A>
- Zhang, Q., Kobras, C. M., Gebhard, S., Mascher, T., & Wolf, D. (2022). Regulation of heterologous subtilin production in *B. subtilis* W168. *Microbial Cell Factories*, *21*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01782-9>

ANEXOS

A. Preparación de medios de cultivo, reactivos y soluciones

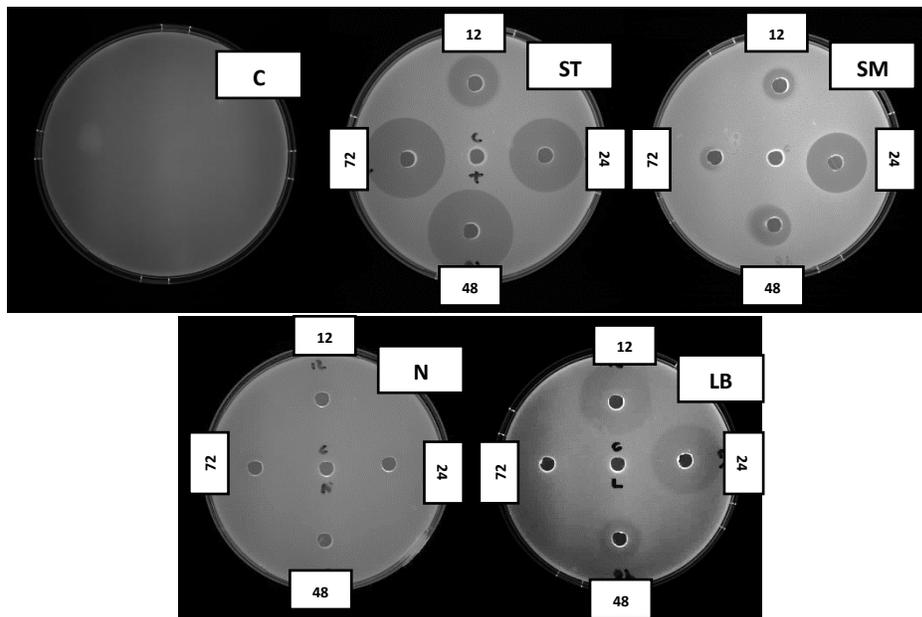
- a. **Medio Schaeffer modificado** (Para 1L agua destilada): 8 g de caldo nutritivo, 1 g de KCl, 0.12 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.19 g de $MnCl_2$, 0.142 g de Na_2SO_4 , 0.0278 g de $FeSO_4$ y se ajustará a un pH de 7.0.
- b. **Medio soya tripticaseína** (Para 1L agua destilada): 17 g de digerido pancreático de caseína, 3 g digerido papaínico de soya, 2.5 g de dextrosa, 5 g de NaCl y 2.5 g de K_2HPO_4 (BD Bacto) y se ajustará a un pH de 7.0.
- c. **Medio Luria Bertani** (Para 1L agua destilada): 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona caseína (US Biological) y se ajustará a un pH de 7.0.
- d. **Medio assay** (Para 1 L agua destilada): se disolverán 10 g de peptona bacteriológica, 3 g de extracto de carne, 3 g de cloruro de sodio, 1.5 g de extracto de levadura, 1 g de azúcar mascabado y se ajustará a un pH final de 7.5 ± 0.2 .
- e. **Solución Ringer**: Se pesarán 9 g de cloruro de sodio, 0.42 g de cloruro de potasio, 0.24 g de cloruro de calcio anhidro, 0.2 g de bicarbonato de sodio. Se aforó a 1 L y se esterilizará en autoclave a $121^\circ C$ por 15 min.
- f. **Reactivo de Bradford** (Para 1 L agua destilada): se disolvieron 100 mg de azul de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol 96 % y 100 mL de ácido fosfórico 85 %. Se aforó a 1 L con agua destilada.
- g. **Solución Bromuro de etidio** [5 $\mu g/mL$]: 100 mL de agua destilada se agregaron 5 μL de la solución de bromuro de etidio [10 mg/mL] de BIO RAD.
- h. **Gel 1.0 % agarosa**: 5 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X.
- i. **Gel 1.5 % agarosa**: 7.5 g de agarosa en 50 mL de TAE 1X.

B. Crecimiento como densidad óptica y actividad antimicrobiana de *B. subtilis* ATCC 6633 en los distintos medios de cultivo durante 72 h.

h	SM		ST		LB		N	
	DO	AA	DO	AA	DO	AA	DO	AA
0	0.01±0.01	0.00±0.00	0.02±0.00	0.00±0.00	0.01±0.00	0.00±0.00	0.02±0.01	0.00±0.00
3	0.04±0.01	0.00±0.00	0.07±0.01	0.00±0.00	0.03±0.00	0.00±0.00	0.08±0.01	0.00±0.00
6	0.71±0.02	0.00±0.00	1.14±0.02	0.00±0.00	0.55±0.02	0.00±0.00	0.79±0.01	0.00±0.00
9	1.09±0.02	0.00±0.00	1.20±0.04	0.00±0.00	0.87±0.01	0.00±0.00	0.85±0.05	0.00±0.00
12	1.18±0.01	10.27±0.93	1.21±0.05	18.10±1.06	0.97±0.02	26.03±0.25	0.82±0.10	11.38±0.32
24	0.99±0.07	22.50±1.34	1.43±0.01	26.43±0.32	1.37±0.01	25.08±0.11	1.40±0.02	10.33±1.45
36	1.32±0.10	0.00±0.00	1.59±0.03	0.00±0.00	1.37±0.04	0.00±0.00	1.38±0.03	0.00±0.00
48	1.19±0.11	12.47±2.53	1.91±0.06	29.33±0.04	1.41±0.06	14.28±0.53	1.31±0.03	9.78±1.95
60	1.18±0.14	0.00±0.00	1.96±0.02	0.00±0.00	1.41±0.05	0.00±0.00	1.26±0.05	0.00±0.00
72	1.16±0.11	11.92±3.25	1.93±0.03	28.23±0.46	1.40±0.05	9.25±0.00	1.33±0.04	11.43±2.16

Hora (h), Densidad óptica 600 nm (DO), Actividad antimicrobiana en mm (AA), Schaefer modificado (SM), soya tripticaseína (ST), nutritivo (N) y Luria Bertani (LB). Se presenta el promedio±desviación estándar, n = 3.

C. Actividad antimicrobiana de la evaluación de caldos de cultivo preliminares, Control (C), Soya tripticaseína (ST), Schaeffer modificado (SM), Nutritivo (N) y Luria Bertani (LB) a 12, 24, 48 y 72 h.



D. Crecimiento como densidad óptica, actividad antimicrobiana, expresada en mm de diámetro de inhibición y en UI/mL y esporulación de *B. subtilis* ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos.

1				
0.0% Extracto de levadura y 1.0/0.2 MgSO₄/MnSO₄				
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.00	0.00±0.00	0	NO
3	0.12±0.07	0.00±0.00	0	NO
6	0.66±0.33	0.00±0.00	0	NO
9	1.00±0.16	0.00±0.00	0	NO
12	1.03±0.14	0.00±0.00	0	NO
24	1.17±0.16	13.48±3.92	1.87	NO
36	1.26±0.07	19.18±0.60	9.93	NO
48	1.36±0.08	20.08±0.32	12.92	NO
2				
0.5% Extracto de levadura y 0.5/0.1 MgSO₄/MnSO₄				
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.00	0.00±0.00	0	NO
3	0.15±0.07	0.00±0.00	0	NO
6	0.74±0.18	0.00±0.00	0	NO
9	0.85±0.20	0.00±0.00	0	NO
12	0.92±0.14	0.00±0.00	0	NO

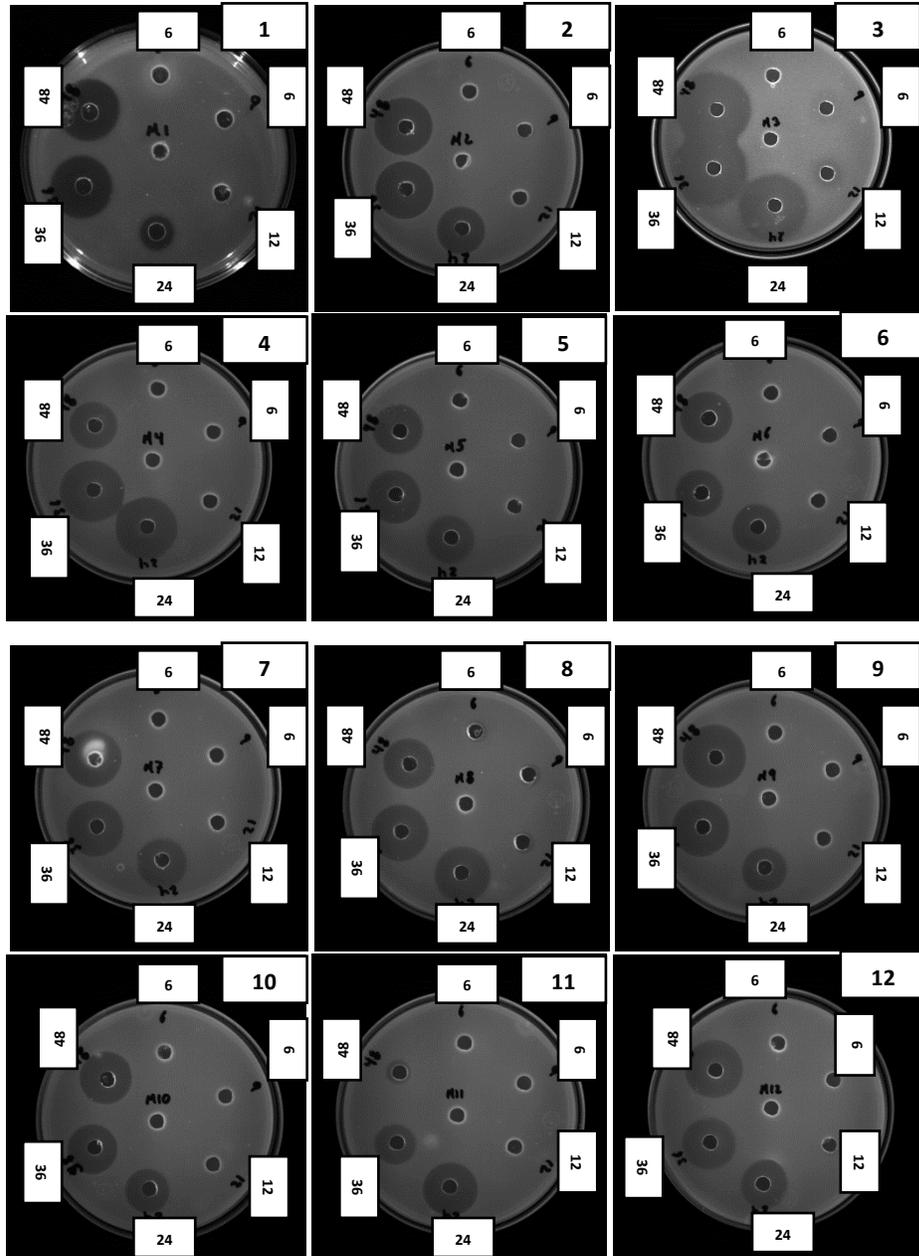
24	1.36±0.15	18.75±2.19	8.76	NO
36	1.41±0.16	18.43±3.92	7.97	NO
48	1.46±0.21	19.43±1.52	10.68	NO
3	0.5% Extracto de levadura y 1.0/0.2 MgSO₄/MnSO₄			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.01	0.00±0.00	0	NO
3	0.13±0.09	0.00±0.00	0	NO
6	0.83±0.23	0.00±0.00	0	NO
9	0.95±0.09	0.00±0.00	0	NO
12	0.91±0.09	4.58±6.47	0	NO
24	1.24±0.09	15.65±2.76	3.53	NO
36	1.37±0.12	18.40±0.42	7.91	NO
48	1.39±0.10	20.58±0.60	14.96	NO
4	1.0% Extracto de levadura y 1.0/0.2 MgSO₄/MnSO₄			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.00	0.00±0.00	0	NO
3	0.20±0.00	0.00±0.00	0	NO
6	0.68±0.31	0.00±0.00	0	NO
9	1.00±0.01	0.00±0.00	0	NO
12	1.03±0.05	0.00±0.00	0	NO
24	1.47±0.11	21.30±0.57	18.63	NO
36	1.57±0.10	20.81±0.91	16.31	NO
48	1.64±0.14	19.45±1.20	11.09	NO
5	0.0% Extracto de levadura y 1.5/0.3 MgSO₄/MnSO₄			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.00	0.00±0.00	0	NO
3	0.11±0.01	0.00±0.00	0	NO
6	0.81±0.02	0.00±0.00	0	NO
9	0.96±0.21	0.00±0.00	0	NO
12	0.95±0.18	0.00±0.00	0	NO
24	1.20±0.02	13.93±5.20	3.49	NO
36	1.40±0.15	17.23±2.79	6.57	NO
48	1.50±0.14	19.88±0.39	12.23	NO
6	0.5% Extracto de levadura y 1.5/0.3 MgSO₄/MnSO₄			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.01	0.00±0.00	0	NO

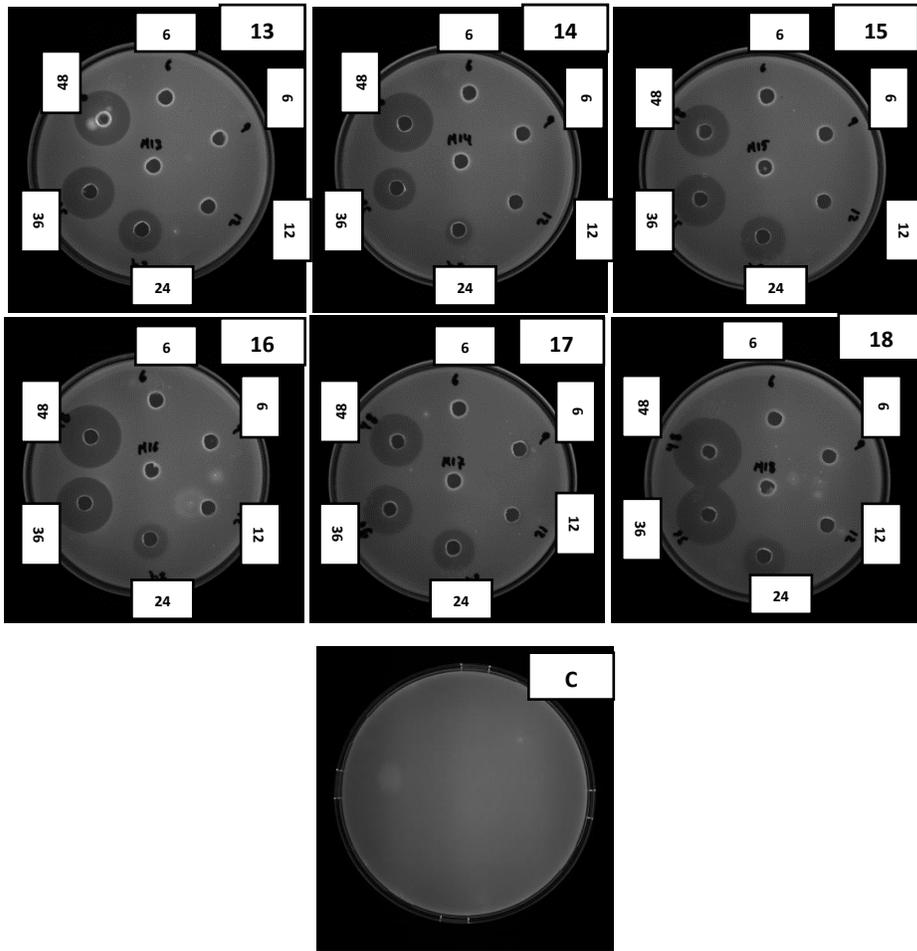
3	0.18±0.01	0.00±0.00	0	NO
6	0.74±0.01	0.00±0.00	0	NO
9	0.84±0.06	0.00±0.00	0	NO
12	0.88±0.03	0.00±0.00	0	NO
24	1.22±0.00	18.08±1.24	7.19	NO
36	1.45±0.11	19.35±0.64	10.45	NO
48	1.57±0.11	19.38±0.25	10.53	NO
7	1.0% Extracto de levadura y 1.5/0.3 MgSO4/MnSO4			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.01	0.00±0.00	0	NO
3	0.49±0.44	0.00±0.00	0	NO
6	0.93±0.07	0.00±0.00	0	NO
9	1.10±0.03	0.00±0.00	0	NO
12	1.10±0.04	0.00±0.00	0	NO
24	1.27±0.10	19.08±0.53	9.64	NO
36	1.54±0.16	20.85±0.35	16.22	NO
48	1.63±0.10	23.03±0.39	30.66	NO
8	0.0% Extracto de levadura y 0.5/0.1 MgSO4/MnSO4			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.00	0.00±0.00	0	NO
3	0.14±0.02	0.00±0.00	0	NO
6	0.79±0.08	0.00±0.00	0	NO
9	1.08±0.14	0.00±0.00	0	NO
12	1.03±0.06	0.00±0.00	0	NO
24	1.19±0.00	16.93±2.30	5.73	NO
36	1.32±0.04	18.53±1.87	8.83	NO
48	1.43±0.01	18.68±0.67	8.66	NO
9	1.0% Extracto de levadura y 0.5/0.1 MgSO4/MnSO4			
Tiempo	DO	AA	UI/mL	Esporas
0	0.02±0.01	0.00±0.00	0	NO
3	0.24±0.08	0.00±0.00	0	NO
6	1.00±0.10	0.00±0.00	0	NO
9	0.96±0.04	0.00±0.00	0	NO
12	0.97±0.02	0.00±0.00	0	NO
24	1.23±0.06	16.50±0.42	4.53	NO
36	1.42±0.03	21.11±0.01	17.47	NO

48	1.60±0.02	24.40±1.13	47.14	NO
----	-----------	------------	-------	----

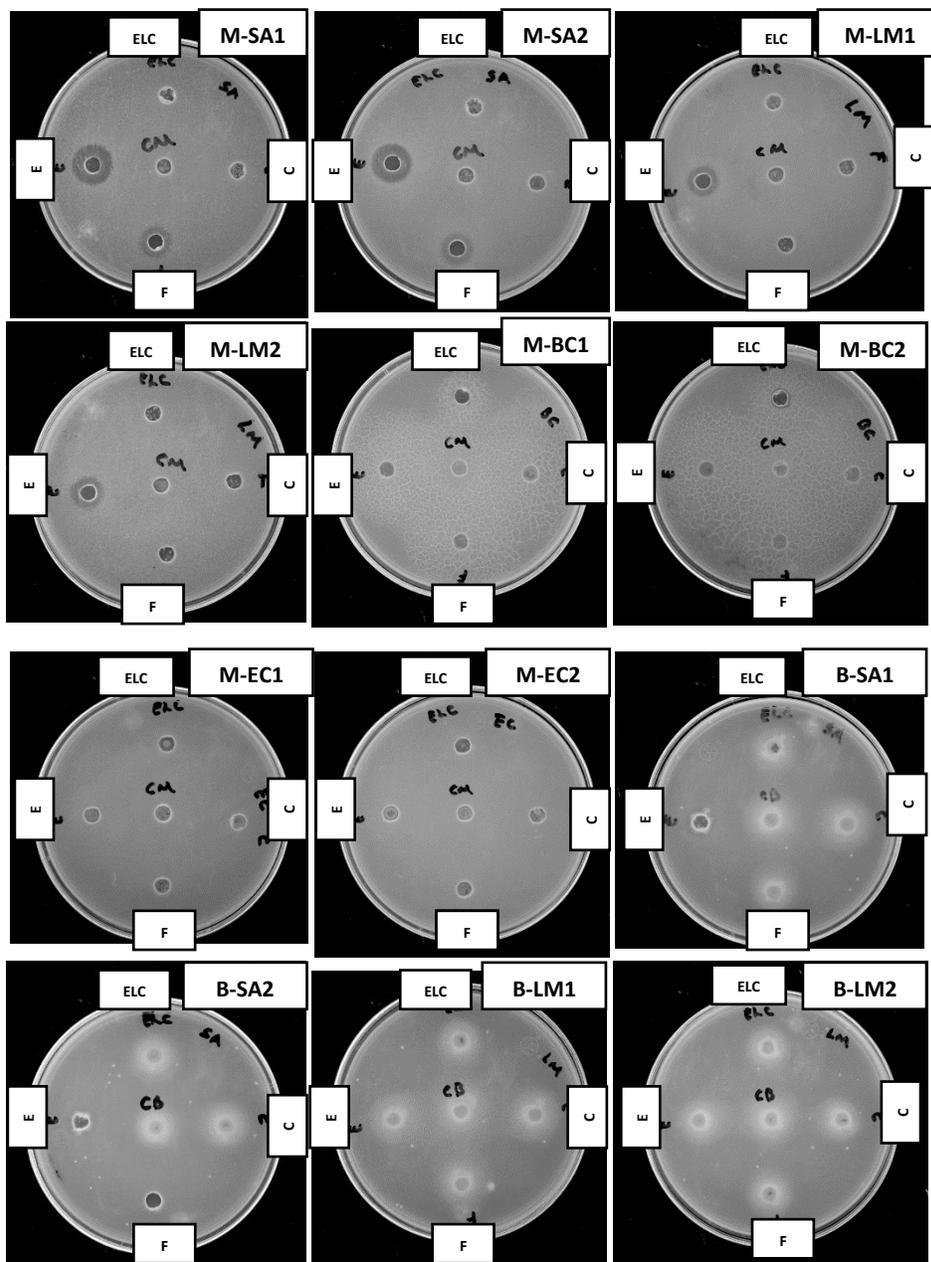
Densidad óptica 600 nm (DO), Actividad antimicrobiana en mm (AA). Se presenta el promedio±desviación estándar, n = 3.

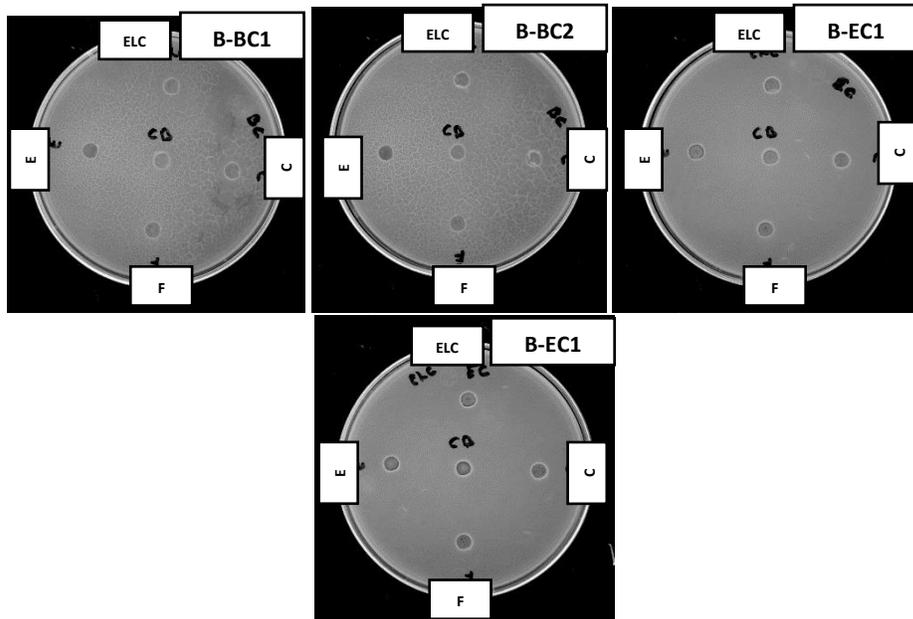
E. Actividad antimicrobiana de *B. subtilis* ATCC 6633 de las cinéticas de crecimiento del diseño de experimentos.



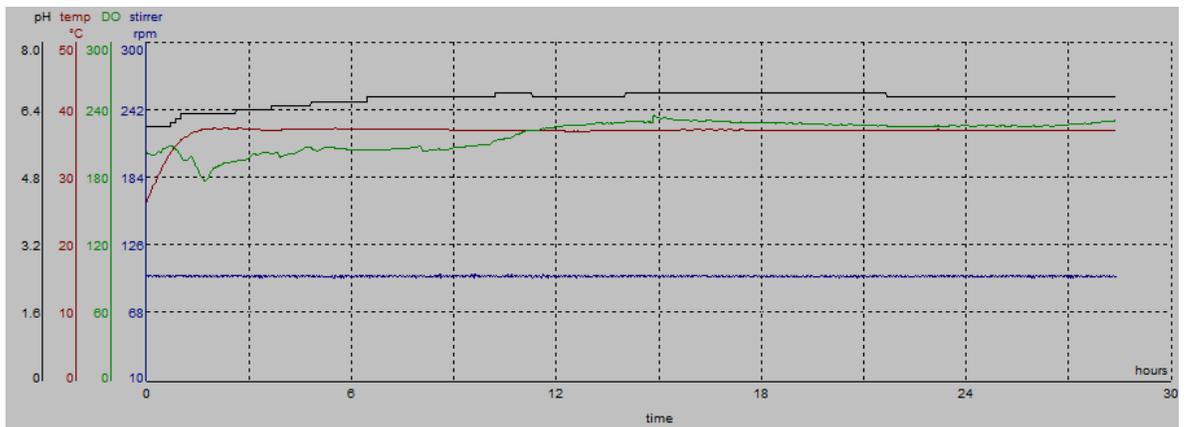


F. Espectro antimicrobiano de los péptidos sintetizados por *B. subtilis* ATCC 6633 a la hora 48 del tratamiento 9 del diseño de experimentos.

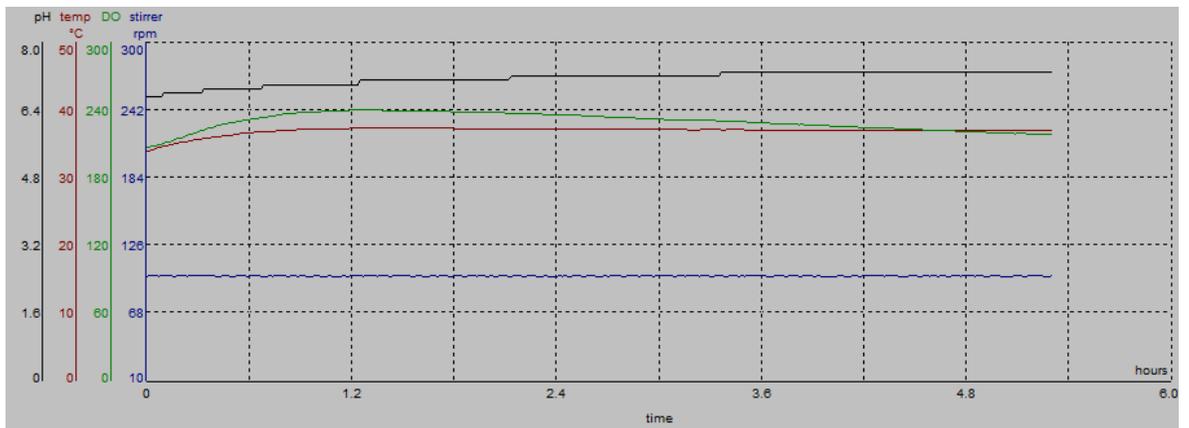




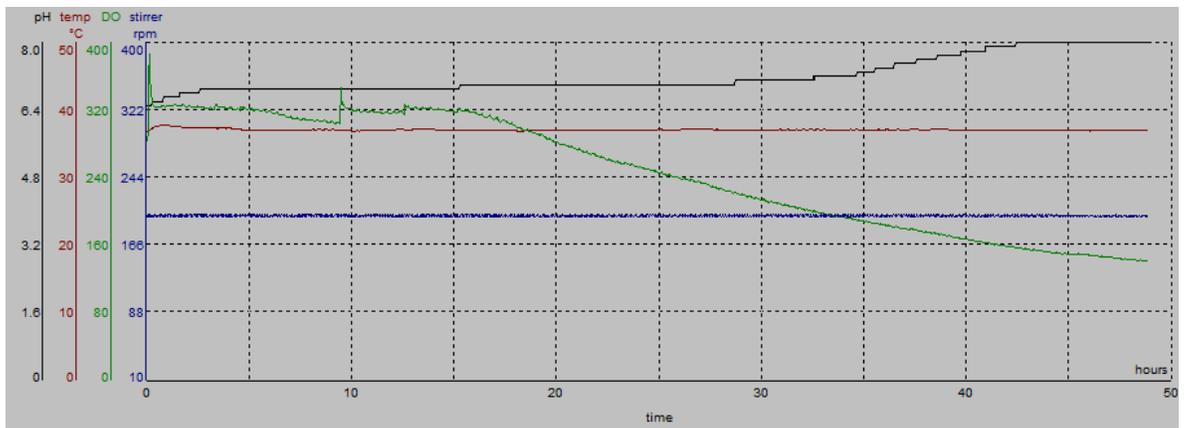
G. Parámetros de pH, temperatura, DO y rpm en biorreactor instrumentado de *B. subtilis* ATCC 6633 durante 48 h.



Escalamiento 1.



Escalamiento 1. Continuación por apagón de luz en el laboratorio



Escalamiento 2.