



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE POSGRADO EN ALIMENTOS DEL CENTRO  
DE LA REPÚBLICA (PROPAC)

MAESTRÍA EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS

**“USO DE SUERO LÁCTEO PARA LA PRODUCCIÓN DE BACTERIOCINAS  
POR *LACTOCOCCUS LACTIS* UQ2 A NIVEL DE BIORREACTOR”**

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS**

**Presenta:**

**IBQ. GRETHEL MARÍA ANTONIETA MONSERRAT PEÑA GOMAR**

**Dirigida por:**

**DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ**

**SINODALES**

DR. CARLOS REGALADO GONZÁLEZ

Presidente

M. EN C. BLANCA E. GARCÍA ALMENDÁREZ

Secretario

DR. JORGE DOMÍNGUEZ DOMÍNGUEZ

Vocal

DR. SCOTT E. MARTIN

Suplente

DR. SERGIO HUERTA OCHOA

Suplente

M. EN C. GUSTAVO PEDRAZA ABOYTES  
Director de la Facultad de Química

DR. SERGIO QUESADA ALDANA  
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario.  
Querétaro, Qro., Junio del 2005  
MÉXICO

**BIBLIOTECA CENTRAL**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

No. Adq. H70733

No. Título \_\_\_\_\_

Clas. TS

641.37

P4200

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*[Faint handwritten mark]*

## RESUMEN

Las bacteriocinas producidas por las bacterias ácido lácticas (BAL) tienen un gran potencial como bioconservadores para el control de las bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos. La producción de bacteriocinas es usualmente realizada en medios complejos, pero el alto costo hace que el proceso no sea viable para su producción a alta escala. Esto ha incrementado el interés en utilizar subproductos de la industria alimenticia como base del medio de cultivo, como el suero lácteo. El objetivo de este estudio fue identificar los factores principales que afectan la producción de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* UQ2, en el extracto libre de células (ELC), usando como suero lácteo suplementado como medio de cultivo alternativo. La actividad de bacteriocina fue analizada utilizando como microorganismo indicador el *Micrococcus luteus* NCB18166. También se determinaron las propiedades antilisteria del ELC. Se estudio el efecto del suero lácteo, extracto de levadura,  $MnSO_4$ ,  $MgSO_4$ , Tween 80 y flujo de aire en la producción de bacteriocina durante el crecimiento de *L. Lactis* UQ2, usando un diseño factorial fraccionado. Los experimentos fueron conducidos en un fermentador Applikon a 30°C, 200 rpm, durante 24 horas. Los resultados muestran que la composición del medio de cultivo tiene un importante efecto en el título de actividad de bacteriocina producida. La variable que no mostró un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) en la producción de bacteriocina fué el flujo de aire. De los resultados del diseño estadístico, se desarrolló el medio de cultivo de suero lácteo suplementado, el cual mostró un mayor título de actividad de bacteriocina que el obtenido en caldo MRS. Por lo tanto en este estudio se demostró la viabilidad de la producción de bacteriocinas en un medio de cultivo alternativo altamente disponible y a bajo costo. Se demostró que la producción de bacteriocinas fue dependiente de la composición del medio de cultivo. El ELC mostró tener actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*. La sensibilidad de siete cepas de *L. monocytogenes* fue analizada en caldo soya tripticaseína (CST). Todas las cepas analizadas fueron sensibles en un amplio rango de concentraciones del ELC. La cepa más sensible fue *L. monocytogenes* 10403S mientras que la *L. monocytogenes* Scott A fue la más resistente. Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) para estas dos cepas fueron 0.171g/L y 0.106g/L, respectivamente. Se determinó el efecto antimicrobiano del ELC a diferentes niveles de pH. La actividad antibacteriana del ELC fue mayor a pH bajo. Sin embargo a valores de pH alcalinos se mantuvo el efecto bacteriostático hacia *L. monocytogenes*. Estos resultados indican que el ELC presenta actividad en un amplio rango de valores de pH. El análisis del efecto antimicrobiano del ELC en las biopelículas de *L. monocytogenes* Scottt A fue también analizado. Los resultados iniciales fueron muy alentadores e indicaron que el ELC es un candidato prometedor para el control de las biopelículas de *L. monocytogenes* desarrolladas en superficies de acero inoxidable.

**Palabras clave:** bacteriocina, suero lácteo, *Listeria*

## SUMMARY

Bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB) have a potential for use as food biopreservatives to control spoilage and pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*. High bacteriocin production is usually achieved in complex media, but their high cost makes the process unsuitable for a large-scale production. There has been increased interest in using by-products from the food industry such as dairy whey, as a basis of the culture media. The aim of this study was to identify the major factors that affect bacteriocin production by *Lactococcus lactis* UQ2, in the cell free extract (CFE), using supplemented whey as an alternative medium. Bacteriocin activity was assayed using *Micrococcus luteus* NCBI8166 as an indicator organism. The anti-listerial properties of the CFE were also determined. The effect of sweet whey, yeast extract, MnSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, Tween 80, and air flow on bacteriocin production during the growth of *L. lactis* UQ2 was studied using a fractional factorial design 2<sup>5-1</sup>. Experiments were conducted in a 3 L Applikon fermenter at 30°C, 200 rpm, for 24 h. Our results showed that the composition of culture media had an important effect in the titer of the produced bacteriocin. The air flow was the only variable showing no significant effect (p<0.05) on bacteriocin production. From the results of the statistical design, we developed a supplemented whey media showing bacteriocin titer higher than those obtained on MRS broth. Therefore, this study demonstrated the feasibility of bacteriocin production using a highly available, low cost raw material. We demonstrated that bacteriocin production was dependent on the medium composition. The CFE showed antimicrobial activity against the food borne pathogen *Listeria monocytogenes*. The sensitivity of seven strains of *L. monocytogenes* was determined in trypticase soy broth (TSB). All strains tested were found to be sensitive to a wide range of CFE concentrations. The most sensitive strain was found to be *L. monocytogenes* 10403S while *L. monocytogenes* Scott A was the most resistant. Minimum inhibitory concentrations (MIC) for these strains were 0.171 g/L and 0.106 g/L, respectively. The efficacy of the CFE at different pH levels was also examined. The bactericidal activity of the CFE was greater at a low pH. However, at alkaline pH values the CFE was still bacteriostatic towards *L. monocytogenes*. These results indicated that this extract has a wide pH range of activity. An examination of the effect of CFE on *L. monocytogenes* Scott A biofilms was also performed. Initial results were very encouraging and indicated that the CFE is a promising candidate for the control of *L. monocytogenes* biofilms on stainless steel surfaces.

**Key words:** bacteriocin, dairy whey, *Listeria*

## *AGRADECIMIENTOS*

*Al CONACYT Por Otorgarme La Ayuda Necesaria Para Seguir Con Mis Estudios De Maestría*

*Al Programa TIES-USDA Por La Ayuda Financiera Para Realizar La Estancia De Investigación En La Universidad De Illinois Urbana-Champaign (Uiuc)*

*Al Dr. Regalado Y La M.C Blanca Por Haberme Brindado Su Apoyo Al Recibirme En El Laboratorio De Biotecnología*

*A La Dra. Elvira De Mejía Por El Apoyo Tanto Moral Como Académico Durante Esta Misma Estancia.*

*Al Dr. Scott E. Martin Por Haberme Recibido En Su Laboratorio De Microbiología De Alimentos En La Universidad De Illinois Urbana-Champaign.*

## DEDICATORIAS

*A Mis Padres De Los Cuales Estoy Muy Orgulla, Por Haberme Enseñado A Alcanzar Las Metas Que Me He Propuesto*

*A Mis Queridas Hermanas, Lorena, Ileana Y A Marycarmen Quien Me Ha Apoyado Siempre Incondicionalmente Mostrándome El Camino.*

*A Mis Compañeros De Laboratorio Tanto Del Laboratorio De Biotecnología, Como A Mis Compañeros De La Universidad De Illinois, Prathiba, Patrick, Flavia Teddy, Dr Cann Y Especialmente A Mi Amigo Adam, Por Su Paciencia, Así También A Mis "Amigos De Illinois" Que Conocí Durante Esta Gratificante Experiencia*

*A Beto Que Sin Su Apoyo No Hubiera Podido Realizar Este Proyecto, Así Como A Mi Querida Amiga Cris Y Compañía Que Siempre Han Estado Apoyándome*

*Y Por Supuesto A Mis Queridos Amigos De La Maestría Que Me Han Brindado Su Valiosa Amistad Y Apoyo, Especialmente A Flavio, Tania, Los Chicos Illinois, Los Gorditos, A Lorenzo Y A Mi Amigo Cuahu.*

*A todos y cada uno Muchisimas Gracias!!*

# ÍNDICE GENERAL

Página

RESUMEN	I
SUMMARY	II
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIAS	IV
ÍNDICE GENERAL	V
ÍNDICE DE CUADROS	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	X
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Conservación de los alimentos	4
2.2 Bioconservación	5
2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL)	5
2.3.1 Clasificación	6
2.4 Género <i>Lactococcus</i>	7
2.4.1 Metabolismo	7
2.5 Metabolitos producidos por las BAL	11
2.5.1 Ácidos orgánicos	11
2.5.2 Peróxido de hidrógeno	11
2.5.3 Diacetilo	12
2.5.4 Reuterina	12
2.6 Bacteriocinas	13
2.6.1 Clasificación de bacteriocinas	13
2.6.2 Propiedades bioquímicas	16
2.6.3 Bacteriocinas de <i>Lactococcus lactis</i>	16
2.6.3.1 Nisina	17
2.6.3.1.1 Toxicidad	19
2.6.3.1.2 Mecanismo de acción	20

2.6.3.1.3 Espectro de inhibición	22
2.6.4 Medición de la actividad de bacteriocina	22
2.6.5 Aplicaciones	23
2.6.6 Producción de bacteriocinas	24
2.6.6.1 Factores que influyen en la producción de bacteriocinas	24
2.7 Suero lácteo	25
2.8 Diseños experimentales	28
2.8.1 Diseños fraccionales fraccionados	30
2.9 <i>Listeria monocytogenes</i>	30
2.9.1 Biopelículas	32
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>36</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>38</b>
4.1 Objetivo General	38
4.2 Objetivos específicos	38
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>40</b>
5.1 Cepas empleadas	40
5.2 Medios de cultivo	40
5.3 Ensayo de la actividad de bacteriocina. Difusión en agar	42
5.4 Producción de bacteriocinas	44
5.5 Corrida de comprobación	48
5.6 Producción de bacteriocinas en medio comercial MRS	48
5.7 Procedimiento para cuenta viable	48
5.7.1 Técnica de Miles y Misra	48
5.7.2 Técnica de extensión en superficie	49
5.8 Determinación de proteína	49
5.9 Determinación de azúcares	49
5.10 Extracto libre de células (ELC)	50
5.11 Extracto de células (EC)	50

5.12 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	50
5.13. Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana	51
5.14. Biopelículas de <i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	51
5.14.1 Preparación del inóculo	51
5.14.2 Preparación de las placas de acero inoxidable	51
5.14.3 Formación de las biopelículas	52
5.14.4 Alimentación de la biopelícula	52
5.14.5 Adición del antimicrobiano a las biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	52
5.14.6 Remoción de <i>L. monocytogenes</i> adherida a las placas de acero inoxidable	53
5.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida	53
5.15.1 Zimograma	53
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>55</b>
6.1 Crecimiento de <i>Lactococcus Lactis</i> UQ2 en suero lácteo suplementado.	55
6.2 Escrutinio de las mejores condiciones de producción de bacteriocinas por <i>L. lactis</i> UQ2 a nivel de bioreactor	57
6.3 Producción del extracto de bacteriocinas en las mejores condiciones obtenidas de acuerdo al diseño de escrutinio	71
6.4 Tiempo de duplicación	75
6.5 Comparación de la fermentación efectuada en las mejores condiciones de producción obtenidas según el diseño de escrutinio, usando el medio comercial MRS	75
6.6 Espectro de Actividad anti-listeria del ELC	80
6.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> más sensible y más resistente ante el efecto del ELC	82
6.8 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del ELC	84

6.9 Efecto antimicrobiano del ELC contra las biopelículas formadas <i>L. monocytogenes</i> Scott A en superficie de acero inoxidable	88
6.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida	91
6.11 Zimograma	94
<b>7. CONCLUSIONES</b>	98
<b>8. REFERENCIAS</b>	100
<b>9. ANEXO</b>	109

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Clasificación de las bacteriocinas	15
2. Características de las bacteriocinas producidas por <i>Lactococcus lactis</i>	18
3. Composición del suero lácteo. En base húmeda	26
4. Usos del suero lácteo	29
5. Características de las cepas de <i>L. monocytogenes</i> utilizadas	41
6. Concentraciones de los componentes del medio de cultivo a base de suero lácteo para la producción de bacteriocinas de <i>L. lactis</i> UQ2	43
7. Diseño $2^{5-1}$ con 3 puntos al centro y valores de actividad modificada los valores de la actividad modificada	62
8. Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial fraccionado $2^{5-1}$	63
9. Niveles de los factores obtenidos para las mejores condiciones de producción de bacteriocinas, de acuerdo al diseño de escrutinio $2^{5-1}$	70
10. Composición del medio de cultivo comercial MRS.	77
11. Sensibilidad de siete cepas de <i>L. monocytogenes</i> ante ELC	81
12. Valores de la reducción de la población de <i>L. monocytogenes</i> Scott A	89
13. Orden y valores de la actividad modificada AM1 y AM2	111
14. Análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta modificadas AM1 y AM2	107

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	Ruta metabólica de la lactosa en el género <i>Lactococcus</i>	8
2.	Metabolismo del citrato en el género <i>Lactococcus</i>	10
3.	Estructura de la nisina	21
4.	Mecanismo de acción de la nisina	21
5.	Etapas de formación de las biopelículas de <i>L. monocytogenes</i>	34
6.	Estrategia experimental	47
7.	Crecimiento de <i>L. lactis</i> en suero lácteo suplementado, en agitador orbital	56
8.	Codificación de los valores reales de operación en la región experimental	58
9.	Medición de las zonas de inhibición en la técnica de difusión en agar.	60
10.	Diagrama de Pareto (a) y gráfica del efecto de interacción (b)	65
11.	Efecto de interacciones dobles de acuerdo al diseño $2^{5-1}$	66
12.	Deseabilidad de la variable modificada de respuesta	67
13.	Curvas de nivel de la variable respuesta AM estimada	69
14.	Gráfica de la fermentación de <i>L. lactis</i> , de acuerdo a la formulación determinada mediante el diseño de escrutinio.	72 67
15.	Determinación gráfica de la velocidad específica de crecimiento.	76
16.	Cinética de producción de bacteriocinas, mediante la fermentación del <i>L. lactis</i> UQ2, en el medio comercial MRS.	79
17.	Determinación del la CMI de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> 10403S la más sensible ante el efecto antimicrobiano del ELCs.	83
18.	Determinación del la CMI de la cepa de <i>L. monocytogenes</i> Scott A la más resistente ante el efecto antimicrobiano del ELC	83
19.	Efecto del pH en la actividad del ELC contra <i>L. monocytogenes</i> Scott A	85
20.	Efecto del pH en la actividad del ELC contra <i>L. monocytogenes</i> 10403S	86
21.	Micrografía Electrónica de Barrido (SEM) de biopelículas de <i>L. monocytogenes</i> Scott A en superficie de acero inoxidable.	90

22.	Electroforesis en gel de poliacrilamida Tris.Tricina	92
23.	Electroforesis en gel de poliacrilamida del ELC	93
24.	Zimograma del EC	95
25.	Zimograma en medio caldo soya tripticaseína CST	96

## 1. INTRODUCCIÓN.

Los alimentos son productos perecederos, fundamentalmente biológicos que, como tales, sufren de transformaciones físicas, químicas y microbiológicas que conducen a su deterioro. Los agentes degradantes en los alimentos son principalmente microorganismos y enzimas. El desarrollo de microorganismos patógenos y/o alterantes en los alimentos, con la subsecuente repercusión sobre la salud, es uno de los problemas primordiales de la industria alimentaria. Por lo que su principal objetivo es obtener alimentos nutritivos inocuos libres de microorganismos patógenos, como es el caso de *Listeria monocytogenes* que se ha podido aislar de leche cruda, quesos (Loncarevic y col., 1995), carne molida de res, productos cárnicos procesados (Ryser y Marth, 1991), carne de pavo y pollo (Genigeorgis y col., 1990) y en el equipo de las industrias procesadoras de alimentos (Zottola y Sasahara, 1994).

A su vez la población demanda el consumo de alimentos más frescos, menos procesados y sin la presencia de aditivos químicos. Esto ha permitido el incremento reciente del interés por diseñar nuevas estrategias de conservación que se adapten a dichos alimentos y que permitan mantener, o incluso prolongar, la vida de anaquel del producto. Recientemente se han desarrollado nuevas estrategias como los métodos de conservación biológica o bioconservación, en donde se pretende extender la vida de anaquel y a su vez, dar una mayor seguridad a los alimentos mediante el empleo de microorganismos o sus metabolitos, que presenten capacidad para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables en el alimento.

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han sido asociadas desde hace mucho tiempo con efectos benéficos a la salud. Son generalmente encontradas en las membranas mucosas de humanos y animales, en productos lácteos y en algunas superficies de plantas; muchas especies han sido utilizadas comercialmente para la producción de leches fermentadas, yogurt, quesos, otros productos lácteos, productos cárnicos, así como también en otros alimentos.

Las diferentes especies de BAL pueden producir una gran variedad de metabolitos de potencial antimicrobiano, incluyendo ácido láctico y acético, compuestos con grupos alfa-carbonilo como diacetilo y acetoina, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas. Las bacteriocinas son moléculas de carácter proteico, generalmente termoestables (algunas soportan 121°C durante 15 min) y resistentes a la acción de algunas proteasas. Son sintetizadas por una gran variedad de bacterias, con un espectro antibacteriano altamente específico, generalmente atacando bacterias relacionadas taxonómicamente. Por ello, se ha puesto un gran interés en la utilización de este tipo de compuestos en la conservación de alimentos.

La actividad antimicrobiana de las bacteriocinas representa un gran potencial para la industria alimenticia ya que se pueden utilizar como conservadores biológicos que en un momento dado podrían reemplazar a los conservadores químicos ya que por ser de naturaleza proteica al biodegradarse no forman compuestos tóxicos. Existen numerosas bacteriocinas producidas por las BAL y cada una tiene espectros de inhibición particulares, esta característica es aprovechada en la industria de los alimentos para utilizarlas de diversas formas. Algunas bacteriocinas se utilizan en procesos que requieren la inhibición del crecimiento de bacterias indeseables específicas estrechamente relacionadas al productor de la bacteriocina, y en otros casos se aplican para inhibir el crecimiento de microorganismos degradadores de alimentos o de patógenos como *Staphylococcus*, *Bacillus* y *Listerias*, respectivamente (Stiles, 1996).

Las BAL son exigentes en sus demandas nutricionales, requieren carbohidratos y aminoácidos como fuente de nitrógeno y una diversidad de factores de crecimiento (Madigan y col., 2000), esto conlleva a que se desarrollen en un medio de crecimiento complejo. Sin duda este tipo de requerimientos específicos ha sido una desventaja al querer producir este tipo de bacterias de manera industrial, ya que se requieren nutrientes específicos que incrementan su costo de producción, además de que se obtienen bajos rendimientos de las bacteriocinas, por lo que es necesario encontrar condiciones de crecimiento óptimas, mediante el uso de herramientas de diseño experimental. Encontrar un medio de cultivo de bajo costo en el que se encuentren los requerimientos nutricionales

para el desarrollo de las BAL, es importante para obtener las bacteriocinas a mayor concentración y por tanto a un menor costo.

El suero lácteo es un subproducto agroindustrial, el cual es producido en grandes cantidades, en 1999 la industria quesera en México produjo 1 millón de toneladas de suero lácteo (SAGAR., 2000). Considerando que por cada kg de queso se producen 9 litros de suero lácteo, se manejan grandes cantidades en las queserías, donde gran parte de este subproducto no es aprovechado. Sin embargo las proteínas son altamente nutritivas, ya que tienen todos los aminoácidos esenciales.

Recientemente se han realizado varias investigaciones sobre la utilización de subproductos agroindustriales como un medio de cultivo alternativo de bajo costo, como es el caso de la utilización de suero (Guerra y Pastrana., 2002b), permeado de suero (Hickmann y Monte., 2001) desechos de mejillones (Guerra y Pastrana, 2002a) y azúcar de remolacha (Egorov y col., 1980). Puede observarse entonces que es importante encontrar un medio de cultivo complejo que represente menores costos de producción, y a través del cual se obtengan mayores rendimientos del producto deseado. El suero lácteo cumple con varios requerimientos nutricionales para las BAL, por lo que se propone en este proyecto el uso del suero lácteo suplementado como un medio de cultivo de bajo costo para la producción a gran escala de BAL (*L. lactis* UQ2) la cual es capaz de sintetizar bacteriocinas como producto de su metabolismo.

## **2. ANTECEDENTES.**

### **2.1 Conservación de los alimentos.**

La conservación de los alimentos ha sido tan antigua como la civilización misma. El hombre para sobrevivir requería de alimentos sanos y frescos que pudieran mantenerse así durante un tiempo prolongado. Actualmente la conservación de alimentos ha ido evolucionando con el transcurso del tiempo, a través de una adecuada selección y a menudo la utilización de más de un sistema de conservación (barreras múltiples). La selección de los métodos de conservación permite el mantenimiento de las características de frescura e inocuidad del alimento. Para evitar la proliferación de gérmenes en los alimentos se recurre al manejo de la temperatura, pH, actividad acuosa, atmósferas controladas, agentes químicos, irradiación, empaques y otros (Ray y Daeschel., 1992).

Entre los métodos tradicionales de conservación se encuentra la deshidratación o desecación, que tiene la finalidad de eliminar el agua del alimento y de esta manera evitando la proliferación de los microorganismos debido a la baja actividad acuosa, ya sea mediante la aplicación de calor o la adición de sustancias. La refrigeración evita efectos de calor sobre los alimentos, descendiendo la temperatura hasta valores de 4° C, mientras que en la congelación se emplean temperaturas por debajo de los 0° C, generalmente se emplea la ultracongelación la cual es una congelación muy rápida a temperaturas alrededor de -20 a -40° C, evitando la formación de cristales de hielo, que alteran la textura de los productos. La esterilización por calor tiene el objetivo de inactivar a los microorganismos mediante la aplicación de temperaturas por arriba de su temperatura crítica en la cual aún pueden sobrevivir (100 a 150 °C) durante 15 min, generalmente se utiliza en alimentos enlatados. La pasteurización es un método de conservación que consiste en elevar la temperatura de los alimentos entre 60 y 80 °C, durante 30 min, destruyendo de esta manera los microorganismos más resistentes. También se utilizan sustancias químicas, que se adhieren al alimento, denominados aditivos, sin embargo cada país tiene una reglamentación muy estricta para regular el empleo de éstos, asegurando la salud del consumidor (INTA, 2001).

Sin embargo, estas tecnologías de conservación de los alimentos tienen influencia en las características organolépticas, así como en la calidad nutrimental de los alimentos. Actualmente se cuenta con tecnologías emergentes de conservación de alimentos, estos métodos son: la irradiación, técnicas de envasado con atmósferas controladas (EAC) atmósferas modificadas (EAM), altas presiones hidrostáticas, pulsos eléctricos y calentamiento óhmico (Alzamora y col., 2000).

A diferencia de las sustancias químicas adicionadas intencionalmente a los alimentos, las sustancias naturales suelen implicar menores riesgos a la salud, puesto que la mayoría de ellas, son generadas por algún material biológico como método de conservación. Algunos de estos compuestos han sido usados durante mucho tiempo, sin que hayan presentado ningún efecto adverso a la salud (Beuchat y Golden., 1989).

## **2.2 Bioconservación.**

El término bioconservador ha sido usado para incluir los compuestos antimicrobianos de plantas, animales, así como de origen bacteriano y que han sido usados en alimentos por largo tiempo, sin ningún efecto adverso a la salud. Su uso alarga la vida de anaquel del alimento y puede ser considerado como bioconservador. Los alimentos fermentados son un buen ejemplo de alimentos bioconservados en los cuales los cultivos iniciadores producen metabolitos con efecto antimicrobiano (Bibek y Bozoglu., 1992). El interés por nuevos métodos de conservación biológica ha aumentado el uso de las bacterias ácido lácticas, debido al efecto antagónico de estos microorganismos o de sus metabolitos antimicrobianos que presentan un gran potencial para ser aplicados como conservadores naturales para controlar el crecimiento de bacterias patógenas o deterioradoras de alimentos (Schillinger y col., 1996).

## **2.3 Bacterias ácido lácticas (BAL).**

Las bacterias ácido lácticas (BAL) son un grupo de bacterias catalasa negativas Gram (+), las cuales desempeñan un papel muy importante en la fermentación de los

alimentos. Generalmente producen una gran variedad de compuestos antimicrobianos incluyendo ácido acético y láctico, peróxido de hidrógeno, dióxido de carbono, alcohol, aldehídos y bacteriocinas, todos los cuales pueden antagonizar el crecimiento de bacterias deterioradoras y bacterias patógenas presentes en los alimentos (Hurst, 1981; Klaenhammer, 1988). Las BAL tienen hábitats muy variados: flora normal de la superficie de material vegetal (frutas y verduras), alimentos ricos en azúcares, leche y derivados, tracto naso-faríngeo y gastrointestinal. Obtienen energía exclusivamente por fermentación de azúcares, ya que carecen de ciclo de Krebs funcional, requieren de una gran variedad de factores nutritivos (aminoácidos, bases nitrogenadas, algunas vitaminas); tienen unas posibilidades anabólicas muy limitadas lo que contribuye a reducir el rendimiento de su crecimiento; toleran concentraciones relativamente altas de ácidos y valores de pH más bajos que el resto de las bacterias. Son anaerobios aerotolerantes; incapaces de respirar porque no pueden sintetizar compuestos porfirínicos y, por tanto, formar una cadena de transporte de electrones. La catalasa necesita de un grupo porfirínico y, por tanto, este tipo de bacterias no tiene esta enzima.

### 2.3.1 Clasificación.

Las bacterias ácido lácticas son un amplio grupo de bacterias Gram (+) cocos y bacilos, no esporulados, microaerófilos, catalasa negativas, ácido o alcalino tolerantes, pueden ser homofermentativas, tienen la habilidad de desarrollarse a altas concentraciones de sal. (Wood, 1999). Estudios taxonómicos sugieren que el grupo de las BAL comprenden los géneros: *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Oenococcus*, *Vagococcus* y *Weissella* (Stiles, 1997).

Los requerimientos nutricionales de las BAL son muy variados y complejos, necesitan aminoácidos, vitaminas, (principalmente las del grupo B), purinas y pirimidinas, además de carbohidratos como fuente de carbono; son mesófilas y aunque algunas pueden crecer por debajo de 5° C o a 45° C, generalmente su temperatura óptima se encuentra entre

25 y 30° C; en lo referente al pH, existen algunas que pueden desarrollarse desde pH de 3.2 a 9.6, pero la mayoría crece a 4 a 4.5

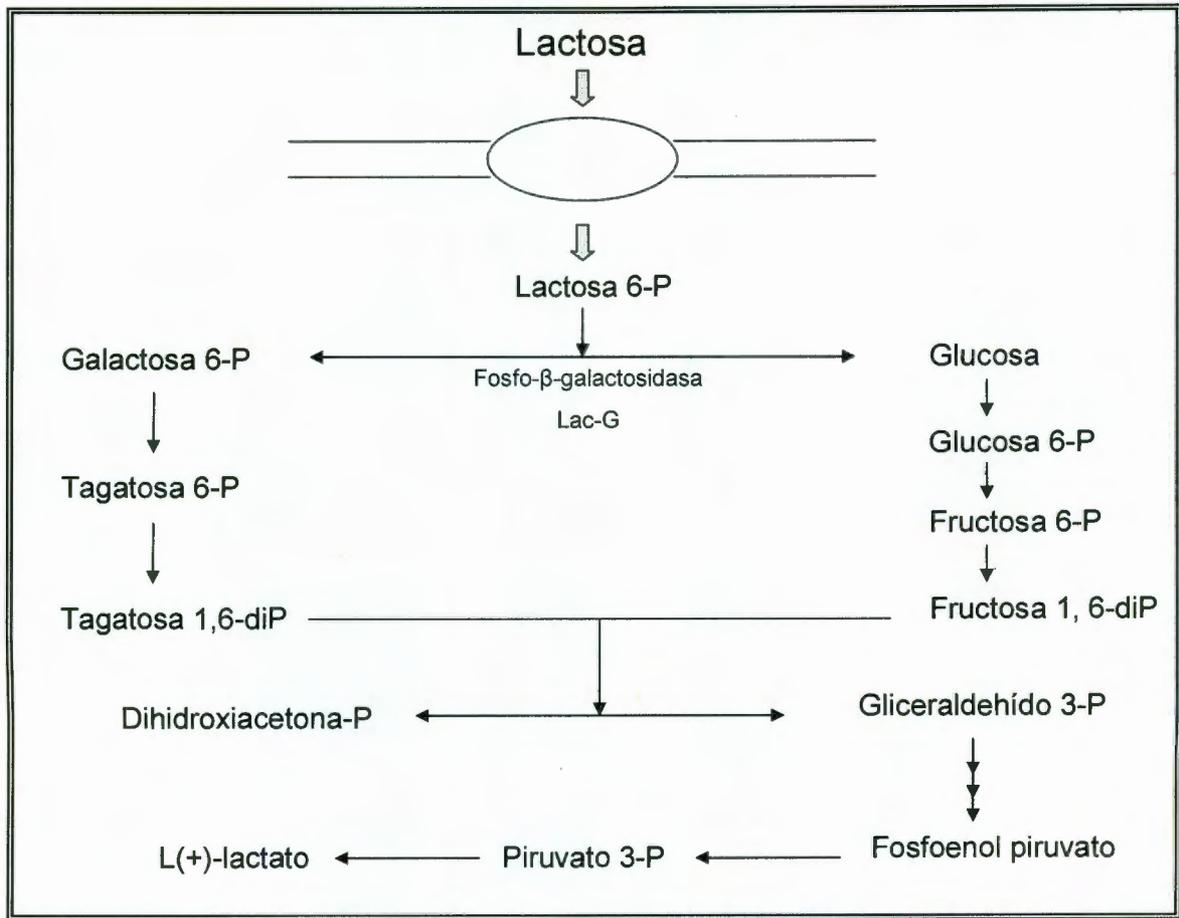
## **2.4 Género *Lactococcus*.**

Las bacterias del género *Lactococcus* son células Gram (+), no esporuladas, producen ácido láctico por fermentación de lactosa, se desarrollan a temperaturas entre 20 a 30°C, denominándose microorganismos mesofílicos. El género *Lactococcus* está íntimamente relacionado con los productos lácteos, pero de cinco especies reconocidas sólo *Lc. lactis* es usada actualmente en la industria láctea. Tres subespecies se pueden distinguir: *Lc. Lactis sp. lactis*, *cremoris* y *hordniae*. Sin embargo, sólo las dos primeras son importantes en la industria láctea (Axelsson., 1993).

### **2.4.1 Metabolismo.**

El metabolismo de los carbohidratos, en este género, es una de las propiedades más importantes e indispensables para la identificación y diferenciación de especies individuales de *Lactococcus*. La ruta metabólica de lactosa la cual es la base de la aplicación industrial de *Lactococcus* se ve en la Fig. 1. La lactosa 6-fosfato la cual es el producto de la traslocación de la lactosa, mediante el sistema de transporte hacia el citoplasma es sintetizada a glucosa y galactosa 6-fosfato por la fosfo-β-galactosidasa, que es metabolizada por la ruta de la tagatosa 6-fosfato a triosa fosfato. Ambas rutas homofermentativas permiten la formación de L-ácido láctico que es excretado al medio.

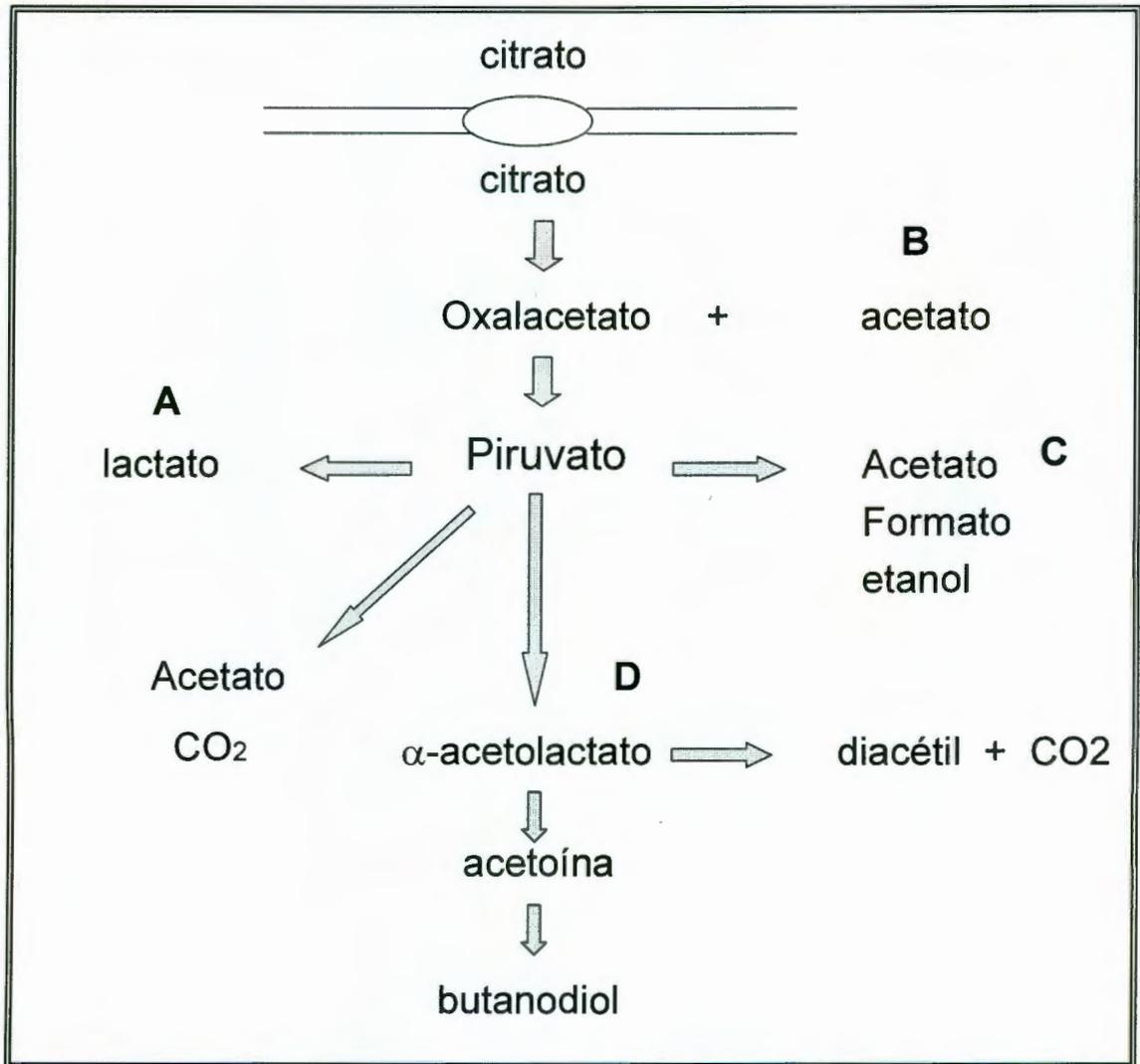
En leche y productos lácteos el género *Lactococcus* produce alrededor de 0.8 % de L-ácido láctico a pH alrededor de 4.6, después de 15 a 20 horas de crecimiento a temperatura ambiente. Las células viables están alrededor de  $5 \times 10^9$  UFC/ml. La viabilidad del *Lactococcus* tiende a decaer rápidamente bajo condiciones ácidas (Wood and Holzapfel, 1995).



**Figura 1.** Ruta metabólica de la lactosa en el género *Lactococcus*  
(De Vos y Vaughan, 1994).

El componente clave en el metabolismo intermediario del *Lactococcus* es el piruvato. Bajo condiciones normales anaeróbicas de glicólisis, el piruvato es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa regenerando el  $\text{NAD}^+$ , éste se utiliza como un aceptor de electrones para la fosforilación a nivel de sustrato el cual es llevado por la oxidorreducción intramolecular del gliceraldehído 3-fosfato por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa a 1,3 fosfoglicerato. Sin embargo el *Lactococcus* posee más de tres rutas metabólicas para el piruvato como se muestra en la Figura 2. Entre las que se encuentran la producción de lactato vía lactato deshidrogenasa (A), la producción de formato, acetato y etanol vía piruvato formato liasa (B). Producción de acetato y  $\text{CO}_2$  mediante la enzima piruvato deshidrogenasa (C). Formación de  $\alpha$ -acetolactato vía  $\alpha$ -acetolactato sintasa (D) y subsecuente producción de acetoína y butanoediol por la  $\alpha$ -acetolactato descarboxilasa y acetoinreductasa. Finalmente la producción de diacetil por desintegración química del  $\alpha$ -acetolactato.

El género *Lactococcus* no posee el ciclo del ácido cítrico, así como una cadena respiratoria, esto podría indicar que es una bacteria completamente anaeróbica sin embargo puede crecer en presencia parcial de oxígeno, debido a que ciertas enzimas metabolizan el oxígeno como la NADH oxidasas tipo flavinas (Bruhn y Collins., 1970) y NADH peroxidasas y superóxido dismutasa (Britton y col., 1978; Hansson y Häggström., 1984). Resultando un fenotipo microaerofílico que no requiere un sustrato libre de oxígeno (por ejemplo la leche) facilitando la aplicación industrial del género *Lactococcus*. Se ha demostrado que la enzima superóxido dismutasa en este género, se encuentra activa en niveles de 5.4 a 11.8 unidades/mg de proteína (Wood and Holzapfel, 1995). Sin embargo el *Lactococcus*, ha desarrollado un sistema único de protección contra ésta enzima. Este sistema esta basado en la acumulación específica del  $\text{Mn}^{2+}$  en altas concentraciones intracelulares (30 a 35 mM), el cual tiene un efecto estabilizador en la superóxido dismutasa (Archibald, 1986).



**Figura 2.** Metabolismo del citrato en el género *Lactococcus*. A. Lactato deshidrogenasa B. Piruvato formato liasa. C. Piruvato deshidrogenasa. D.  $\alpha$ -acetolactato sintasa (Hugenholtz y col., 1993).

## **2.5 Metabolitos producidos por las BAL.**

### **2.5.1 Ácidos orgánicos.**

Las BAL fermentan los carbohidratos por diferentes vías metabólicas y durante este proceso se obtienen ácidos orgánicos (principalmente láctico y acético) que no son utilizados por las células y se excretan al exterior (Klandler, 1983). Los ácidos orgánicos contribuyen a la estabilidad de los alimentos, mediante la inhibición de microorganismos deterioradores. El mecanismo de acción se basa, en parte, en la disociación molecular de los ácidos orgánicos en el medio, lo cual da lugar a la aparición de protones y aniones. Se produce un aumento en el gradiente de protones para evitar la desnaturalización de las enzimas presentes en las estructuras celulares expuestas (pared celular, membrana y espacio periplásmico), pudiendo causar también desestabilización de la permeabilidad de la membrana (Konings y Otto, 1983). Los ácidos láctico y acético, en su forma no disociada, debido a su naturaleza lipofílica, pueden atravesar la membrana celular y disociarse en el citoplasma. Esto afecta de dos maneras: interfiriendo con las funciones celulares, como la translocación del sustrato y la fosforilación oxidativa; por otro lado, la disociación de los ácidos orgánicos provoca el incremento de protones en el interior de la célula. Cuando la concentración de protones excede la capacidad tampón del citoplasma se transportan hacia el exterior mediante la bomba de protones, reduciendo de esta manera las reservas energéticas de la célula. Agotándose éstas, la bomba de protones se detiene y se provoca el descenso del pH interno, lo cual causa a su vez desnaturalización de proteínas y desestabilización de otros componentes estructurales y funcionales de las células, dando como resultado final la muerte celular (Piard y Desmazeaud, 1992).

### **2.5.2 Peróxido de hidrógeno.**

Las BAL producen peróxido de hidrógeno, como mecanismo de protección frente al oxígeno, mediante la acción de oxidasas o NADH peroxidasas (Condon, 1987). El  $H_2O_2$  se acumula en el medio de crecimiento al no producirse catalasa en estos microorganismos. La acción bactericida del  $H_2O_2$  se atribuye a su efecto altamente oxidante, mediante

peroxidación de los lípidos de la membrana y la destrucción de la estructura básica molecular de proteínas celulares. En la leche cruda, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por las bacterias lácticas puede reaccionar con tiocianato endógeno, catalizado por la lactoperoxidasa, para formar productos de oxidación intermedios como hipotiocianato (OSCN<sup>-</sup>) u otros ácidos. El principal efecto de estos metabolitos es la oxidación de grupos sulfidrilo de enzimas metabólicas, tales como las hexoquinonas, las aldolasas y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (Dahl y col., 1989).

### 2.5.3 Diacetilo.

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto producido por bacterias lácticas fermentadoras del citrato. Posee un efecto antimicrobiano a elevadas concentraciones; a bajas concentraciones, puede ser metabolizado por algunos microorganismos. Su acción antimicrobiana es mayor, frente a microorganismos Gram (-), levaduras y mohos. El grupo  $\alpha,\alpha$ -dicarbonil de la molécula, reacciona con la porción guanidino del aminoácido arginina en enzimas microbianas (alcohol deshidrogenasa, adenilato ciclasa, glutamato deshidrogenasa y transcetolasa), desactivándolas por bloqueo o por modificación de la zona catalítica (Lindgren y Dobrogosz, 1990). Aunque el diacetilo se considera sustancia GRAS (generalmente reconocido como seguro) su utilidad es reducida debido a que se requieren cantidades demasiado elevadas para que ejerza un efecto inhibitorio y a que posee un aroma intenso.

### 2.5.4 Reuterina.

La reuterina ( $\beta$ -hidroxipropionaldehído) es una sustancia antimicrobiana producida por *Lactobacillus reuterii*, microorganismo presente en el tracto gastrointestinal, así como en los productos cárnicos. Es un metabolito neutro asociado directamente con el metabolismo anaeróbico del glicerol. La reuterina presenta un amplio espectro de inhibición, es activa frente a microorganismos como *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Candida*, y algunos protozoos como *tripanosoma*. Le reuterina actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, que cataliza el primer paso de la

síntesis del ADN, lo que explicaría su amplio espectro de actividad (Requena y Peláez, 1995).

## **2.6 Bacteriocinas.**

Las bacteriocinas se han definido como un grupo heterogéneo de compuestos antimicrobianos los cuales son producidas por un largo y diverso número de especies bacteriales, variando su modo de acción, espectro de actividad, peso molecular, propiedades bioquímicas y origen genético (Klaenhammer, 1993). Presentan actividad bactericida contra grupos relacionados taxonómicamente pero no contra la cepa productora. Son de naturaleza proteica ya que son sensibles a proteasas. Se ha demostrado que tratamientos con lipasas y solventes orgánicos no causan pérdida de la actividad. Los péptidos permanecen activos después tratamientos con altas temperaturas y a pH relativamente bajos (Salminen y von Wrioth., 1993). Pueden ser empleadas como conservadores biológicos en alimentos ya que algunas son activas contra microorganismos patógenos y deterioradores, por ejemplo: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Cl. Perfringes*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, entre otros (Lewus y Montville, 1991).

Las bacteriocinas son sintetizadas como precursores en los ribosomas y los péptidos maduros usualmente consisten de 20 a 60 aminoácidos. Existe una gran diversidad de péptidos, de acuerdo a su longitud, secuencia y composición de aminoácidos, secreción y procesamiento y actividad antimicrobiana. Casi todas las bacteriocinas peptídicas tienen carga neta positiva a pH neutro o significativamente positivas a pH ácido y generalmente contienen secuencias hidrofóbicas y/o anfifílicas (Gasson y de Vos., 1994).

### **2.6.1 Clasificación de bacteriocinas.**

Diversos estudios han sido realizados para clasificar las bacteriocinas de las BAL (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996; Holo y col., 1991 y McAuliffe y col., 2001) de acuerdo a sus propiedades bioquímicas, peso molecular, espectro de actividad, mecanismo

de acción y sistemas de producción y excreción. La clasificación actualmente aceptada se muestra en el Cuadro 1.

Las bacteriocinas clase I, lantibióticos (Schnell y col., 1998; Sahl y Bierbaum, 1998; McAuliffe y col. 2001) son producidos como péptidos precursores los cuales sufren modificaciones post-traduccionales. Los péptidos maduros contienen aminoácidos modificados tales como 2,3-dideidroalanina, D-alanina, y 2, 3-didehidrobutirina, así como anillos característicos de lantionina que resulta de la formación de un tioéter entre el lado de la cadena de cisteína y serina o treonina.

Las bacteriocinas clase II se caracterizan por la secuencia consenso YGNGVXCXXXCXV en su parte N-terminal, incluyendo dos cisteínas que forman un puente disulfuro (Eijsink y col., 1998). Otra característica de estas bacteriocinas es su fuerte efecto inhibitorio contra en *Listeria*. Las bacteriocinas clase IIa son producidas por LAB pertenecientes a los géneros *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Carnobacterium* y *Leuconostoc*. También se han encontrado que en organismos no pertenecientes a bacterias lácticas, tales como *Bifidobacterium bifidum* (Yildirim y Jonhson., 1999) y *Bacillus coagulans* (Le Marrec y col. 2000). La clase IIb, son bacteriocinas cuya actividad depende de la acción combinada de dos péptidos (Nissen-Meyer y col., 1992). En algunos casos uno o ambos de los péptidos individuales pueden estar completamente inactivos, como es el caso de la Lactococcina G. En otros casos, un péptido individual puede mostrar actividad, pero existe un efecto sinergista en la actividad, al combinarse ambos péptidos. Las bacteriocinas clase IIc contienen todas las bacteriocinas no-lantibióticos que no pertenecen a las clases IIa y IIb. Esta clase representa una gran diversidad de bacteriocinas derivadas de una gran diversidad de BAL. Aunque existe el hecho de que algunas bacteriocinas clase IIc muestran una similitud de secuencias (Casaus y col., 1997), no se han establecido subgrupos.

<p><b>Clase I</b> Lantibióticos</p>	<p>Péptidos pequeños termoestables (&lt;5 kDa). Tipo A: Moléculas flexibles Tipo B: Moléculas globulares</p>
<p><b>Clase II.</b> No-Lantibióticos</p>	<p>Péptidos pequeños termoestables no modificados (&lt;10kDa). Subclase IIa. Bacteriocinas tipo pediocina Subclase IIb. Bacteriocinas con dos péptidos Subclase IIc. Otras bacteriocinas peptídicas</p>
<p><b>Clase III.</b> Bacteriocinas tipo proteínas</p>	<p>Péptidos grandes termolábiles (&gt;30kDa).</p>

**Cuadro 1.** Clasificación de las bacteriocinas.

### 2.6.2 Propiedades bioquímicas.

Debido a la naturaleza proteica todas las bacteriocinas se inactivan por una o más enzimas proteolíticas, incluyendo a aquellas de origen pancreático (tripsina y  $\alpha$ -quimotripsina) y algunas de origen gástrico, como la pepsina. Esta característica es muy interesante con respecto a la utilización de bacteriocinas en productos alimentarios, puesto que serían inactivadas durante su paso por el tracto intestinal, sin ser absorbidos como compuestos activos y sin causar, por tanto, los riesgos relacionados con el uso de antibióticos (Lloyd y Drake, 1975).

La termotolerancia de las bacteriocinas de las BAL es generalmente elevada y parece estar relacionada con su estructura molecular, normalmente compuesta por péptidos pequeños que no presentan estructura terciaria. Por otro lado, algunas bacteriocinas son termolábiles, poseen una estructura más compleja. La termoresistencia generalizada de las bacteriocinas permite que permanezcan activas después de tratamientos térmicos equivalentes a la pasteurización de la leche (63°C, 30 min; 72°C, 15 seg.), lo que supondría una ventaja adicional en productos pasteurizados.

Las bacteriocinas son generalmente estables al pH ácido o neutro. La máxima solubilidad y estabilidad de la nisina es a pH 2.0, disminuyendo estas propiedades conforme aumenta el pH. La estabilidad a pH ácido o neutro de las bacteriocinas indica una adaptación al entorno natural de las bacterias que las producen (Piard y Desmazeaud, 1992).

### 2.6.3 Bacteriocinas de *Lactococcus lactis*.

El género *Lactococcus* es ampliamente utilizado en la industria láctea. Este género involucra la producción del lantibiótico nisina, lactococinas, lactostrepcinas y diplococcina (Kok y col., 1993).

La Lacticina 481, es un lantibiótico de 17 kDa, producido por *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CNRZ481, a pH de 5.5. Esta bacteriocina presenta actividad bactericida contra otras cepas de *Lactococcus*, así como cepas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Clostridium tyrobutyricum*.

La Lactococcina G, es producida por *Lactococcus lactis* LmG 2081, tiene carácter catiónico. Su actividad depende de la acción complementaria de dos pépticos  $\alpha$  y  $\beta$ , una característica de las bacteriocinas clase IIa (anti-Listeria).

En el Cuadro 2, se muestran las características importantes de bacteriocinas producidas por *L. lactis*

### 2.6.3.1 Nisina

Producida por varias cepas de *L. lactis* subsp. *lactis*, es el lantibiótico que ha sido utilizado en aplicaciones comerciales en la industria de alimentos. Se aisló en 1928, comenzó a utilizarse como aditivo en algunos alimentos de la década de los '50 y actualmente es considerada como GRAS (generalmente reconocida como segura) por la FDA (Food and drug Administration, USA). Presenta actividad antimicrobiana contra un rango limitado de bacterias Gram-positivas, particularmente sobre aquellas formadoras de esporas. Es particularmente útil para inhibir especies de *Clostridium* como *botulinum* y *tyrobutyricum*. Se ha podido demostrar la efectividad de la Nisina en productos lácteos, se requiere de 5 a 500 UI/g o ml (1 $\mu$ g de nisina = 40 UI), para la inhibición contra *Bacillus* y *Clostridium*. La nisina es una sustancia polipeptídica producida por *Lactococcus lactis*. Es una molécula ácida y por lo tanto exhibe su mayor estabilidad bajo condiciones ácidas (Delves-Broughton, 1990).

**Cuadro 2.** Características de las bacteriocinas producidas por *Lactococcus lactis*.

Bacteriocina	Microorganismo productor	Espectro de inhibición	Características	Referencias
Diplococcina	<i>L. lactis ssp. cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	35.3 kDa. Termoestable (100°C, 60 min). Sensible a quimotripsina, tripsina, pronasa y pepsina. Determinantes genéticos en plásmido (83kb).	Davey, 1984
Nisina	<i>L. lactis ssp. lactis</i>	Bacterias Gram positivas	3.5 kDa. Termoestable (100°C, 10 min). Resistente a pronasa, tripsina y pepsina y sensible a quimotripsina y pancreatina. Estable a pH ácido, hasta pH 6.8. Determinantes genéticos codificados en un transposón (70kb).	Hurst, 1981 Liu y Hansen, 1990
Lacticina 481	<i>L. lactis ssp. lactis CNRZ 481</i>	Bacterias lácticas <i>Cl. tyrobutyricum</i>	2.9 kDa. Termoestable (100°C, 60 min). Sensible a quimiotripsina, pronasa, proteinasa k y cuajo. Determinantes genéticos transmisibles por conjugación.	Piard y col., 1990
Lactoestrepina	<i>L. lactis ssp. lactis y cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i> <i>Streptococcus spp.</i> <i>Leuconostoc spp.</i>	Termoestables (121°C, 10 min). Estables a pH inferiores a 5. Sensibles a tripsina, pronasa, quimotripsina y lipasas.	Kozak y col., 1978
Lactococcina A	<i>L. lactis ssp. lactis y cremoris</i>	<i>Lactococcus spp.</i>	3.4 kDa. Termoestable (100°C, 30 min) Sensible a tripsina. Determinantes genéticos en plásmido.	Holo y col., 1991
Lactococcinas B y M	<i>L. lactis ssp. cremoris 9B4</i>	No determinado	Determinantes genéticos en plásmido (60kb)	Van-Belkum y col., 1992

La nisina es un péptido pequeño de 34 aminoácidos sintetizado ribosomalmente. Tiene un peso molecular de 3.5 kDa; no contiene ningún aminoácido cíclico, pero contiene cuatro tipos de aminoácidos inusuales: dehidroalanina, dehidrobutirina, lantionina y  $\beta$ -metillantionina. Los dos últimos aminoácidos son formados por la unión de cisteína con la dehidroalanina y dehidrobutirina, respectivamente y estos forman un tioéter. En la Figura 3. Se muestra la estructura de la nisina.

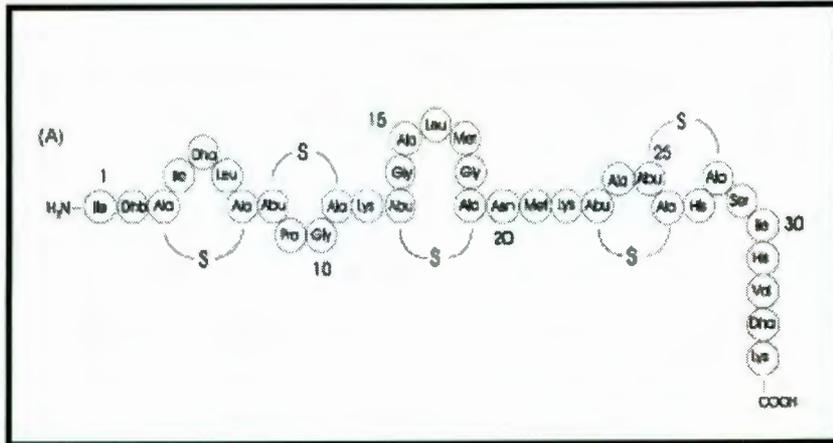
Entre las modificaciones post-transduccionales de la nisina se encuentra la deshidratación de serina y treonina, la formación de puentes tioéter y la remoción de 23 aminoácidos del segmento líder de la parte NH<sub>2</sub>-terminal; las moléculas de prenisina son modificadas a las moléculas de nisina activa y excretadas en el medio (Buchman y col; 1988).

La nisina es soluble en ambientes acuosos, pero es más soluble a bajos pH; tiene un punto isoeléctrico (pI) de 8.9. Su actividad antibacterial es retenida a bajos pH, pero destruida a pH por arriba de 9.0, en almacenaje por largos períodos de tiempo, a temperaturas de esterilización (121°C/15 min, cerca del 50%), refrigeración y congelación. Algunas enzimas proteolíticas pueden inactivarla. (Delves-Broughton., 1990).

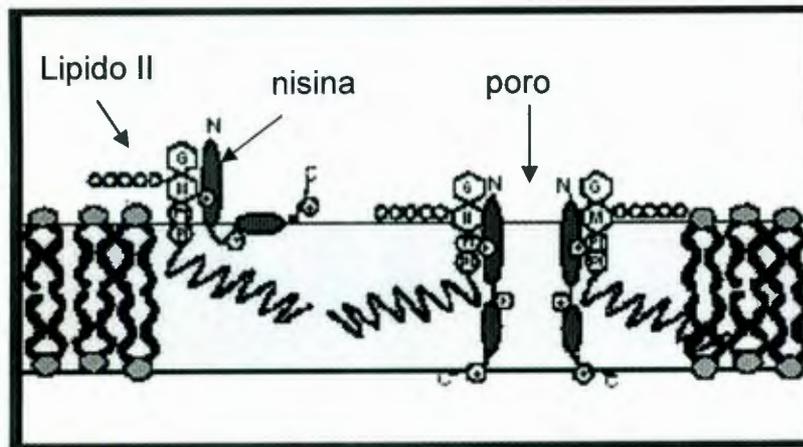
Diversos estudios sobre alimentación animal han demostrado que el consumo de nisina en animales no es tóxica, y no tiene ningún efecto en la flora intestinal del tracto digestivo (FDA, 1988).

#### **2.6.3.1.1 Toxicidad**

La nisina ingerida es destruida rápidamente durante la digestión y sus aminoácidos constituyentes se metabolizan junto con los procedentes de las otras proteínas. Prácticamente carece de toxicidad o de poder alergénico (Shtenberg y Ignatev, 1970). Se han realizados estudios de toxicidad de nisina en ratas, se determinó que la dosis letal media LD<sub>50</sub>, es similar a la sal común, que es alrededor de 7g/kg (Davison y Branen, 1993).



**Figura 3.** Estructura de la nisina



**Figura 4.** Mecanismo de acción de nisina. La nisina requiere de una molécula de lípido II precursor de la membrana celular, formando complejos nisina-lípido II conllevando a la formación de poros. (Wiedemann y col., 2004).

La secretaria de salud en México, establece una concentración máxima permisible de nisina del 0.00125%, en quesos procesados (NOM-121-SSA1-1994).

#### **2.6.3.1.2 Mecanismo de acción**

Estudios recientes, sobre el mecanismo de acción de la nisina, han demostrado que la nisina es el primer antibiótico conocido que utiliza una molécula como sitio de unión a la membrana citoplasmática de la célula sensible. La interacción específica con el precursor de la pared celular, Lípido II, con la nisina define la formación de poros, los cuales son estables por segundos y presentan un diámetro de poro de 2 a 2.5 nm (Wiedeman y col., 2004).

En la Figura 4, se muestra el modelo propuesto por Wiedemann, el segmento N-terminal de la nisina es esencial para la unión de ésta, con la molécula de lípido II. La parte amino-terminal del antibiótico con ayuda de la molécula de Lípido II, se desplaza a través de la membrana celular. El lípido II cambia la orientación de la nisina en las membranas de paralela a perpendicular con respecto a la superficie de la membrana (Van Heusden y col., 2002). La estabilidad del poro formado, incrementa en milisegundos y el proceso de formación de poro es independiente del gradiente de voltaje. Esto sugiere que las interacciones entre el lípido II y la nisina, estabilizan la orientación transmembranal de los péptidos. Las interacciones del grupo amino de la cadena lateral de los residuos de lisina en el antibiótico, con los grupos pirofosfatos del lípido II son muy viables, explicando de esta manera la reducida selectividad aniónica del poro (Bonev y col., 2004). La formación de los complejos lípido II-nisina, que tienen una relación de 8 moléculas de nisina por 4 moléculas de lípido II (Hasper y col., 2004), son ensamblados, incrementando el flujo de liposomas, aminoácidos y ATP a través del poro. Conllevando esto a la muerte celular (Wiedemann y col., 2001).

### 2.6.3.1.3 Espectro de inhibición.

La actividad antimicrobiana de la mayoría de las bacteriocinas es directamente contra especies cercanamente relacionadas a la cepa productora, incluyendo bacterias patógenas y formadoras de esporas, como *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* respectivamente. La nisina presenta un amplio rango de inhibición, es activa frente a un extenso número de microorganismos Gram (+), incluyendo los géneros *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Micrococcus* y *Listeria*; impidiendo también el desarrollo de esporas de *Clostridium* y *Bacillus* (Yang y Ray, 1994).

El método más usado para la determinación de la actividad de las bacteriocinas ha sido el desarrollado por Tramer y Fowler en 1964. Se utiliza el método de difusión en agar, para la valoración de la actividad de nisina, como microorganismo indicador se utiliza el *Micrococcus luteus*, en el cual existe una relación proporcional entre el logaritmo del diámetro de inhibición y la actividad de nisina expresada en unidades internacionales (UI).

### 2.6.4 Medición de la actividad de bacteriocina.

El primer análisis de la susceptibilidad antimicrobiana que utilizó la difusión del antibiótico a través del agar, fué realizado por Fleming en 1924 con penicilina contra *Staphylococcus aureus*. Esta técnica consiste en realizar huecos en el agar, en donde es añadido el antimicrobiano en forma líquida. Las placas de agar son previamente inoculadas con el microorganismo indicador. El agente antimicrobiano se difunde en el agar, inhibiendo el crecimiento del microorganismo indicador. El diámetro de la zona de inhibición es el resultado de la difusión del compuesto antimicrobiano y de la velocidad de crecimiento del microorganismo indicador (Linton, 1977). La difusión del compuesto antimicrobiano a través del agar, depende del peso molecular, de la carga iónica, y de la composición del gel. La temperatura y la viscosidad del gel también pueden afectar la difusión del antimicrobiano. La concentración del agente antimicrobiano afecta directamente el diámetro de la zona de inhibición; a mayor concentración, más grande es el diámetro de la zona de inhibición, bajo condiciones estándar.

Grandes zonas de inhibición son usualmente formadas cuando la bacteria crece lentamente (debido a temperatura adversa o medio bajo en nutrientes), y pequeñas zonas de inhibición son usualmente formadas cuando el crecimiento bacteriano ocurre rápidamente (Muriana, 1996). Diversos factores pueden afectar la determinación de la actividad. El ensayo de actividad de bacteriocina depende de las condiciones del análisis y de la susceptibilidad del microorganismo indicador utilizado. La densidad del indicador es un factor importante en el método de sensibilidad. La difusión de la bacteriocina durante el análisis es un factor crucial a considerar. La nisina muestra una pobre difusión durante el ensayo de actividad. La difusión se puede incrementar añadiendo Tween 80 (Hurst, 1981).

### **2.6.5 Aplicaciones.**

La aplicación de las bacteriocinas en sistemas alimenticios, puede ser empleada en tres métodos básicos:

1. La aplicación de las bacterias ácido lácticas productoras de bacteriocinas. Un cultivo puro de BAL viable para la producción de bacteriocinas, puede ser aplicado como una manera indirecta para incorporar bacteriocinas a un producto alimenticio. El éxito de este método depende de la habilidad de la BAL para desarrollarse y producir bacteriocinas, en el medio ambiente del alimento. La preparación puede contener compuestos que no interfieren con la actividad de bacteriocina, como por ejemplo, sales y proteínas.

2. Aplicación de un extracto de bacteriocinas obtenido por crecimiento de BAL en un medio de cultivo. Este método es generalmente empleado para la producción de preparaciones de nisina por crecimiento de BAL (productoras de nisina) a temperaturas óptimas de crecimiento. Durante el transcurso de la fermentación, la nisina es excretada al medio de cultivo, el cual es pasteurizado, matando la bacteria, pero sin inactivar la nisina, debido a que es termoestable.

3. La aplicación de preparaciones purificadas o semipurificadas de bacteriocinas. Aquí la dosis de la bacteriocina es más exacta, y los componentes innecesarios del medio de

cultivo están ausentes. El efecto antimicrobiano de estas preparaciones puede ser más predecible y de esta manera evitar los efectos indeseables. Sin embargo la producción de estas preparaciones es más costosa que las anteriores, debido a los complejos procedimientos de purificación de las bacteriocinas, que son requeridos para remover los componentes del medio de cultivo. La aplicación de estas preparaciones es limitada, debido a las regulaciones legales de los aditivos alimenticios (Alzamora y col., 2000).

#### **2.6.6 Producción de bacteriocinas.**

Se han realizado diversos estudios acerca del mejoramiento en el rendimiento en la producción de bacteriocinas. Los avances en el conocimiento de la estructura, organización genética y modo de acción de las bacteriocinas producidas por bacterias lácticas, ha permitido un gran avance en el conocimiento de la relación estructura-función de estas sustancias, así como de los fenómenos relacionados con su procesado, maduración y secreción. De esta manera se hacen posibles los estudios sobre mejora en las características de solubilidad, difusión y estabilidad de las bacteriocinas en los alimentos, así como aumento en su espectro de inhibición. Este aumento en el espectro de inhibición se podría conseguir mediante la construcción de péptidos en donde haya sustituido aminoácidos por otros que confieran mayor actividad (Hansen, 1993).

##### **2.6.6.1 Factores que influyen en la producción de bacteriocinas.**

Para que las bacteriocinas presenten una aplicación comercial efectiva, es necesario obtener mayores rendimientos en su producción, modificando las condiciones de crecimiento o por regulación genética (Biswas y col., 1991). La producción de bacteriocinas puede incrementarse, bajo ciertas condiciones de crecimiento, como la temperatura, el pH y el tiempo de incubación (Ennahar y col., 2000; Krier y col., 1998), así como también la composición del medio de cultivo, influye fuertemente en el rendimiento de las bacteriocinas (De Vuyst, 1995).

Se ha demostrado que la adición de algunos azúcares simples (sacarosa, glucosa, manitol) y extracto de levadura, al medio de cultivo así como la concentración de algunos iones, el pH y la temperatura del medio, la fuerza iónica y el potencial de óxido reducción, influyen en la producción de bacteriocinas (Lewus y Montville, 1992). Sin embargo algunos factores, como la presencia de sal en concentraciones del 2 al 8%, han reducido notablemente la biomasa celular y la producción de las bacteriocinas como sakacina, sugiriendo que la presencia de las moléculas de NaCl interfieren con la unión del receptor con la molécula del microorganismo antagónico, reduciendo la actividad antimicrobiana (Nielsen y col., 1998; Leroy y De Vuyst, 1999). Otras investigaciones en las cuales se ha incrementado el rendimiento en la producción de las bacteriocinas, suplementando los medios de cultivo preparados comercialmente, tales como el APT (Himmelbloom, 2001), el MS, MS10 (Lejeune y col., 2001), suplementado estos medios de cultivo con componentes como peptonas, extracto de carne, extracto de levadura y MgSO<sub>4</sub> (Kim, 1997 y Li y col., 2002), así como el medio comercial más utilizado el MRS (Callewaert y de Vuyst, 2000) el cual se suplementó con diferentes fuentes de nitrógeno (extracto de levadura y peptona bacteriológica).

También se han realizado investigaciones acerca de la producción de bacteriocinas en medios de cultivo alternativos, como el desperdicio de mejillones (Guerra y Pastrana., 2002a), a nivel de matraz agitado, permeado de suero (Hickmann y Monte., 2001) y suero lácteo (Guerra y Pastrana., 2002b).

## **2.7 Suero lácteo.**

El suero lácteo es un subproducto generado durante la producción de queso, aún después del desuerado este subproducto es altamente nutritivo, la composición del suero se muestra en el cuadro 3. El suero es un fluido semiopaco de color amarillento. Existen dos tipos de suero: el ácido y el dulce.

**Cuadro 3.** Composición del suero lácteo. En base húmeda

<b>COMPONENTE</b>	<b>CONCENTRACION</b>
Proteína soluble	0.70 %
Grasa	0.80 %
Lactosa	4.80 %
Minerales	0.70%
Agua	93%

El dulce resulta de la manufactura de productos que principalmente usan enzimas tipo renina a pH 5.6. El suero ácido se obtiene de la fabricación de productos lácteos donde el coágulo se forma por acidificación a un pH menor a 5.1 (Bylund, 2002).

El suero lácteo es uno de los materiales más contaminantes que existen en la industria alimentaria. Cada 1,000 L, genera cerca de 35 kg de demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y cerca de 68 kg de demanda química de oxígeno (DQO). Esta fuerza contaminante es equivalente a la de las aguas negras producidas en un día por 450 personas (Shah y Jelen, 1991). Las propiedades funcionales y nutricionales del suero han sido muy estudiadas (Morr y Ha, 1993). Solo el 51.2 % del suero líquido producido en los Estados Unidos es utilizado para la industria alimentaria (ADPI., 2002). Es una fuente rica de proteínas, hidratos de carbono y minerales de alta calidad. Las proteínas más importantes del suero son la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina, existen proteínas menores entre las que se encuentran las proteosomas-péptidos; proteínas sanguíneas y lactoferrina, son fácilmente digeridas, además el suero contienen un perfil de aminoácidos que satisface o sobrepasa los requerimientos de aminoácidos esenciales especificados por la Organización para la Agricultura y Alimentación (FAO), así como la Organización Mundial de la Salud (OMS), es decir son reconocidas como proteínas de alta calidad.

La  $\beta$ -lactoglobulina es aproximadamente el 50% del contenido de proteínas de suero en la leche bovina, esta tiene la función de enlazar el calcio y el zinc. La  $\alpha$ -lactoalbúmina representa aproximadamente el 25% del contenido total de las proteínas del suero en la leche bovina. En la leche humana, representa el 28% del total de las proteínas. La albúmina e inmunoglobulinas del suero son proteínas sanguíneas que se incorporan en la leche y que se recuperan como proteínas de suero menores. La lactoferrina y lactoperoxidasa, son otras proteínas del suero. La lactoferrina, puede actuar también como inmunomodulador y es el factor más importante de resistencia ante enfermedades no específicas encontrado en la glándula mamaria. La lactoperoxidasa es una enzima que utiliza al peróxido de hidrógeno. Este componente nutracéutico de los productos de la leche y suero es una enzima con propiedades antibacteriales.

Varios procesos que utilizan el suero lácteo incluyen la producción de concentrado de suero, lactosa, proteína de suero, biogas, etanol, y la producción de bacteriocinas como la nisina (Liu y col., 2003). La calidad nutricional del suero, le permite ser usado como medio de cultivo para la producción de diversos metabolitos, suplementándolo con nutrientes esenciales. En el cuadro 4. Se presentan las características del uso de suero.

## **2.8 Diseños experimentales.**

Al diseñar un medio de cultivo es muy importante asegurar que los nutrientes necesarios se encuentren presentes en la forma y concentración necesaria. Los microorganismos requieren fuentes de nitrógeno, carbono, oxígeno e hidrógeno, además de iones inorgánicos que actúan como fuente exógena de energía y factores de crecimiento para su desarrollo. La optimización del medio de cultivo se refiere a encontrar las condiciones (nutricionales en concentraciones adecuadas, temperatura, concentración de oxígeno, etc.) que permitan obtener el mejor crecimiento celular o la síntesis de un producto o metabolito en particular (Rhodes y Stanbury., 1997). Se han propuesto varias estrategias de optimización, una de las más ventajosas y utilizadas actualmente es un diseño estadístico experimental, el cual permite evaluar una o más variables independientes al mismo tiempo. El diseño estadístico de experimentos se debe usar como una metodología que permita plantear distintas estrategias para seleccionar, controlar, analizar e interpretar diferentes condiciones de estudio en un fenómeno de una manera objetiva y sistemática. El diseño de experimentos tiene una enorme utilidad en la industria porque permite mejorar el rendimiento de los procesos y la calidad de sus productos. También en el desarrollo de nuevos productos, a nivel de laboratorio o de planta piloto. El diseño estadístico de experimentos desempeña un papel muy importante. Múltiples ejemplos de aplicaciones se dan en la biotecnología, química, veterinaria, agronomía, educación entre otras, en las que se realiza investigación experimental, siendo así esta metodología una herramienta de mucha utilidad (Castaño.y Domínguez., 2003).

**Cuadro 4.** Usos del suero lácteo.

<b>UTILIZACION</b>	<b>Comercialización</b>
Suero en forma líquida	Alimentación animal Alimentación humana: bebidas fermentadas, galletas
Concentrado de suero.	Alimentación animal Galletas, confitería, panadería. Fabricación de lactosa Fabricación de quesos fundidos
Tratamiento térmico, calentamiento a 95°C	Precipitado de proteínas (lactoalbuminas y lactoglobulinas) Hidrolizados de proteína (alimentación animal)
Concentración y cristalización del suero	Obtención de lactosa extracción de proteínas suero en pasta (rico en proteínas y minerales)
Fermentaciones	Bacterias lácticas. - conservadores alimenticios (ácidos orgánicos) - industria textil, etc. Fermentaciones butíricas - industria química Levaduras - producción de alcohol

(Alais., 1988)

### **2.8.1 Diseños fraccionales fraccionados.**

Este tipo de diseños es muy utilizado en experimentos en los que se cuenta con la intervención de varios factores, y es útil para estudiar el efecto conjunto sobre una variable de respuesta. Un uso importante de los diseños factoriales fraccionado se da en los experimentos de escrutinio, los cuales son experimentos en donde se consideran muchos factores con el fin de identificar aquellos que tienen efectos importantes en la variable respuesta. Los experimentos de escrutinio suelen realizarse en las primeras fases del proyecto cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco efecto o ningún efecto sobre la variable de respuesta (Montgomery, 1991).

Este tipo de diseños experimentales son muy útiles en la identificación de los factores más importantes y las interacciones entre dos o más factores en relativamente pocos experimentos.

### **2.9 *Listeria monocytogenes*.**

El género *Listeria* comprende las siguientes especies: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seligeri*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. grayi*, y *L. dentrificans* (Seelinger y Jones., 1986). Son bacilos gram-positivos, cortos de entre 0.4 a 2  $\mu\text{m}$ . No esporulados; a temperatura entre 20 y 25°C son móviles por medio de flagelos, pero a 37°C forman un flagelo polar. La temperatura óptima de crecimiento es de 30-37 °C. Son aerobios, anaerobios facultativos, catalasa positivos.

Solamente *L. monocytogenes* y *L. ivanovii* han sido asociadas a enfermedades humanas, *L. monocytogenes* es la especie más importante desde el punto de vista de la salud, ya que ha sido aislada con mayor frecuencia en laboratorios clínicos, ha sido aislada de una gran variedad de fuentes, como agua dulce, agua salada, polvo ambiental, fertilizantes y vegetación en descomposición; alimentos para animales, alimentos crudos de origen animal, incluidos aves frescas y congeladas, carnes rojas y productos cárnicos; pescado, productos lácteos crudos como leche, quesos y helados; frutas y vegetales crudos; y a partir de heces de seres humanos sanos y sintomáticos como también de otros animales.

A pesar de su ubicuidad la incidencia anual de listeriosis es de 0.7% por 100,000 casos, aunque la tasa anual de infección es de 3 veces más alta en mayores de 70 años y 17 veces más alta en embarazadas (Cherubin y col., 1991). A diferencia de otras infecciones transmitidas por alimentos tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 30%.

Se considera actualmente que el hábitat primario de *L. monocytogenes* es el suelo y los vegetales en descomposición en los que se puede desarrollar en forma saprófita. Debido a que el microorganismo tiene una amplia distribución, contamina frecuentemente los alimentos durante su producción o procesamiento (Schwartz, y col., 1989). Los datos epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana (Swaminathan y col., 1995). *L. monocytogenes* es un parásito intracelular facultativo, puede sobrevivir en macrófagos e invadir células no fagocíticas como las células epiteliales, hepatocitos y células endoteliales. La capacidad del microorganismo para penetrar en el citoplasma de la célula, proliferar y diseminarse a las células adyacentes es esencial para la expresión plena de su potencial patogénico. Su unión a la célula huésped se produce por una proteína (integrina), que luego es fagocitada por la célula huésped. En el fagolisosoma es sometida a un ambiente hostil con pH y ferritina activando una exotoxina (listeriocina O) que es capaz de lisar la membrana del fagolisosoma en 30 min y escapar al citoplasma. La toxina se une al colesterol e interrumpe las membranas y tal vez es el factor que conduce a una interrupción de las membranas fagolisosómicas y a un crecimiento sin restricciones de *Listeria* dentro del citoplasma del fagocito. La *listeria* se disemina de célula a célula sin ponerse en contacto con el medio extracelular, lo que implica la necesidad de una inmunidad mediada por células (Amstrong, 1995; Vázquez-Boland y col., 2001).

La sensibilidad de *L. monocytogenes* ha sido estudiada arduamente. El efecto inhibitorio de las bacteriocinas de las BAL contra *L. monocytogenes* en varios sistemas alimenticios ha sido bien documentada y sugiere que las bacteriocinas tienen un potencial como conservadores para el control de *L. monocytogenes* en quesos suaves (Wan y col. 1997). De acuerdo a Benkerroum y col. 2000; concluyeron que la producción de bacteriocinas *in situ* protege contra *L. monocytogenes* previniendo una eventual

contaminación post-procesamiento en productos lácteos. En los productos lácteos mínimamente procesados, se pueden adicionar estas bacteriocinas y a su vez combinar varias barreras tales como acidificación, refrigeración y otro aditivo para inhibir o reducir el crecimiento microbiano indeseable.

La acidificación de los alimentos con ácidos orgánicos de cadena corta es un buen mecanismo para controlar el crecimiento de microorganismos patógenos en una gran variedad de alimentos. Sin embargo algunos estudios han demostrado que *L. monocytogenes* es más ácido tolerante que la mayoría de los organismos patógenos relacionados con toxi-infecciones alimentarias, aunque la sensibilidad del microorganismo al ácido orgánico, varía con la naturaleza del acidulante utilizado (Sorrells y col., 1989). En estudios realizados con diferentes ácidos orgánicos a diferentes pH (3 y 4) encontraron que los que presentaron mayor efecto antimicrobiano contra *L. monocytogenes* fueron: benzoato, formato, malato y lactato. Los que no presentaron un efecto en la inactivación de *Listeria* fueron el ascorbato y citrato. A su vez la combinación de dos ácidos orgánicos como el formato y el ácido láctico o etanol inhibieron el desarrollo de *L. monocytogenes* cuando fue expuesta a pH 3.0 (Barker y Park, 2001).

### **2.9.1 Biopelículas**

Muchas bacterias son capaces de adherirse y colonizar superficies, mediante una matriz tri-dimensional de polímeros extracelulares, llamadas biopelículas, formando organizaciones microbianas que presentan características como heterogeneidad, diversidad de microambientes, resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular que las convierten en complejos difíciles de erradicar de los ambientes donde se establecen.

Estas biopelículas permiten a los microorganismos, resistir la desecación, la luz UV, y el tratamiento con antimicrobianos y agentes sanitizantes (Borucki y col., 2003). En muchas formas la biopelícula representa una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana y cuenta con un sistema de canales que le permiten establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de desecho.

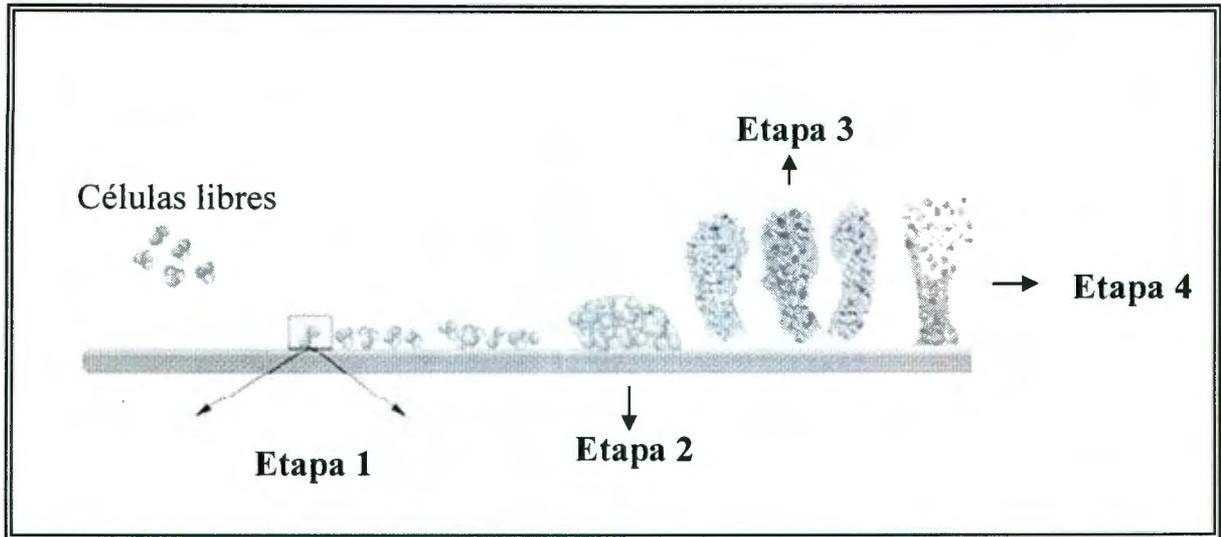
Superficies de acero inoxidable, son nichos particularmente importantes para la adherencia de *Listeria*, siendo éstas áreas, críticas para el control de la contaminación de patógenos en industrias procesadoras de alimentos. *Listeria monocytogenes* ha sido generalmente encontrada en ambientes de procesamiento de alimentos; en las manos de los trabajadores que laboran en estas empresas (Kerry y col., 1993) y también en el equipo industrial utilizado, como biopelículas adheridas a estos (Zottola y Sasahara, 1994). Ciertas cepas de *L. monocytogenes* pueden llegar a establecerse en áreas como superficies de drenaje, en donde la microflora puede permanecer durante años o meses (McBain y col., 2003; Tompkin, 2002).

Numerosos desinfectantes se han desarrollado para prevenir la contaminación de este microorganismo en plantas procesadoras de alimentos. La mayoría de los análisis se han desarrollado en células libres y se ha demostrado que una vez adheridas las bacterias a las superficies, son más resistentes a los agentes desinfectantes. Se han evaluado diversos tipos de sanitizantes como: ácido acético, NaOH, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, amoníaco y gliceril monolaurato (Chavant y col., 2004). Aunque se ha realizado importantes avances en el diseño de procedimientos de limpieza con diversos sanitizantes en equipo y áreas de planta procesadoras de alimentos, no se ha logrado remover eficazmente a este microorganismo.

El proceso de adherencia de los microorganismos a diversas superficies es muy complejo y las características tanto de la membrana celular del microorganismo como de la superficie de soporte juegan un papel muy importante (Blake y col., 1998). En la Figura 5 se observan las diferentes etapas del desarrollo de la biopelículas, las cuales constan de 4 pasos:

1. Adhesión electrostática de las células a la superficie
2. Adhesión irreversible de las células a la superficie
3. Maduración de la biopelícula
4. Liberación de la biopelícula

Se inicia el proceso de adherencia de las células microbianas a la superficie adherente, las cuales son distribuidas en la superficie mediante la difusión de un cierto



**Figura 5.** Etapas de formación de las biopelículas. 1. Adhesión electrostática de las células a la superficie. 2. Adhesión irreversible de las células a la superficie. 3. Maduración de la biopelícula. 4. Liberación de la biopelícula.

volumen de medio, donde una fracción de estas células pueden ser adsorbidas a la superficie, mediante interacciones electrostáticas (paso 1) de la membrana celular y la superficie, manteniéndose adheridas un cierto periodo de tiempo, y después pueden ser liberadas al medio, este fenómeno se denomina adsorción reversible. Esta liberación de las cierto número de células es debido a la acción de la tensión superficial (Eppich, 2000). Sin embargo algunas células se mantienen adheridas, mediante la formación de un exopolisacárido extracelular, que refuerza la adherencia de las células hacia la superficie (paso 2) desarrollando de esta manera la biopelícula. La maduración de la biopelícula formada (paso 3) se realiza mediante la acumulación y desarrollo de más células bacterianas. Sin embargo pueden existir la adherencia de otros microorganismos a la colonia ya formada. La disponibilidad de nutrientes es el principal factor que determina la sobrevivencia bacteriana de una población, por lo cual existe una competencia por nutrientes entre la población que conforman la biopelícula y los microorganismos presentes en el medio (células libres), lo que da como resultado la liberación de los microorganismos presentes en la biopelícula (paso 4).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

Ante el auge en el consumo de alimentos sin aditivos químicos, se han realizado investigaciones acerca de métodos alternativos que no involucren sustancias sintetizadas para la conservación de alimentos. Las bacterias ácido lácticas, clasificadas como GRAS (generalmente reconocidas como seguras), tienen la capacidad de producir compuestos antimicrobianos como las bacteriocinas, las cuales presentan un gran potencial para ser utilizadas como conservadores de origen natural.

Muchas bacteriocinas inhiben bacterias patógenas como *Listeria monocytogenes*, la cual puede crecer a temperaturas de refrigeración. La contaminación de alimentos por *L. monocytogenes* ocurre más frecuentemente en ambientes de procesamiento de alimentos donde las células pueden persistir, debido a su habilidad para adherirse a superficies de procesamiento de alimentos, como el acero inoxidable. Una vez adheridas estas células pueden producir biopelículas multicelulares, que son resistentes a la desinfección y que pueden ser fuente de contaminación de productos alimenticios.

Para que las bacteriocinas presenten una aplicación comercial, es necesario obtener altos rendimientos de producción a bajo costo. Sin embargo, el rendimiento en su producción es bajo, aumentando de esta manera su costo de producción. Debido a que su producción se ve influenciada por factores ambientales, las BAL requieren condiciones de crecimiento complejas, aumentando de esta manera su costo de producción. Por lo tanto es necesario evaluar medios de crecimiento alternativos, en los cuales se obtenga un mayor rendimiento de las bacteriocinas, con el fin de hacer viable un escalamiento del proceso de fermentación.

En la industria láctea de nuestro país se producen grandes cantidades del subproducto suero lácteo, este es parcialmente aprovechado en la alimentación animal, en la elaboración de leches maternizadas y de manera incipiente para la elaboración de concentrados proteínicos de suero (CPS) desperdiándose una cantidad no reportada por las organizaciones competentes en México, considerando que el suero lácteo es un

excelente fuente de todos los aminoácidos esenciales y de minerales, es importante utilizar este subproducto de la industria ya que cuenta con un alto valor nutritivo.

Se plantea en este trabajo, la utilización de suero lácteo como un medio de cultivo alternativo de bajo costo para la producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis*, determinando los factores que influyen la producción de éstas, la cinética de crecimiento del microorganismo productor y la formulación que permita una mayor producción de bacteriocinas, a través del diseño estadístico de experimentos.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1 OBJETIVO GENERAL.

- ✚ Determinar los factores que influyen la producción del extracto de bacteriocinas por *Lactococcus lactis* UQ2 utilizando como medio de cultivo suero lácteo suplementado a nivel de biorreactor; así como también evaluar el efecto antimicrobiano de bacteriocina contra siete cepas de *Listeria monocytogenes* a diferentes valores de pH y en la biopelícula formada por de la cepa más resistente de *L. monocytogenes*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✚ Determinar los factores más relevantes del medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado para la producción de bacteriocinas de acuerdo a un diseño experimental de escrutinio.
- ✚ Establecer las mejores condiciones de producción de bacteriocinas, en base al diseño de escrutinio.
- ✚ Comparar la producción de bacteriocinas usando el medio de suero suplementado, contra el medio sintético MRS.
- ✚ Determinar las cinéticas de producción de actividad de bacteriocina y biomasa, la velocidad específica de crecimiento, el perfil de pH y consumo de azúcares, durante la fermentación.
- ✚ Realizar pruebas de antagonismo entre la bacteriocina y diferentes cepas de *Listeria monocytogenes*., así como la CMI (concentración mínima inhibitoria) de la cepa de *Listeria* más resistente y más sensible ante el antimicrobiano.

- ✦ Evaluar el efecto del pH en la actividad antimicrobiana usando las cepas de *L. monocytogenes* más resistente y más sensible encontradas.
- ✦ Analizar el efecto de las bacteriocinas contra la viabilidad de las biopelículas formadas por la cepa de *L. monocytogenes* más resistente determinada.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS.

### 5.1 Cepas empleadas.

Como microorganismo productor de bacteriocinas, se utilizó la cepa de *Lactococcus lactis* UQ2, la cual fue aislada de un queso fresco en el laboratorio de biotecnología de alimentos del DIPA, Facultad de Química, en la Universidad Autónoma de Querétaro. Este microorganismo fue previamente caracterizado por los laboratorios Midilabs (DE, USA), por la homología en sus bancos de datos con la secuencia del gen que codifica para la subunidad 16S rRNA. Se utilizó como microorganismo indicador para la prueba de actividad de bacteriocinas la cepa de colección *Micrococcus luteus* NCIB 8166. Para evaluar el efecto anti-listeria se utilizaron siete cepas de *Listeria monocytogenes* descritas en el Cuadro 5. Esta parte del proyecto se realizó en la *Universidad de Illinois Urbana-Champaign, en el laboratorio de microbiología de alimentos a cargo del Dr. Scott E. Martin.*

### 5.2 Medios de cultivo.

Para la activación inicial de la cepa productora de bacteriocinas *L. lactis* se utilizó el caldo MRS (de Man Rogosa y Sharpe, Oxoid, CM359, UK), este medio se utilizó también para la corrida de comprobación a nivel de biorreactor. Caldo APT (BBL, Cat. 10918, USA) para la activación subsecuente de la cepa, así como Agar APT (Oxoid, Cat. 265430, USA) para la conservación de la misma. Para el conteo de la población de *L. lactis* se utilizó el Agar MRS (Oxoid, Cat. 288210, USA).

Para la medición de la actividad de bacteriocina, utilizando como microorganismo indicador *M. Luteus* NCIB 8166; para la activación del microorganismo se utilizó el medio Assay (Tramer y Fowler, 1964) que consta de la siguiente formulación: peptona, 10g/L (Bioxon, Cat. 232200, México); extracto de levadura, 1.5 g/L (Oxoid, Cat. L21, Inglaterra); extracto de carne, 3g/L (Bioxon, Cat. 160. México); NaCl, 3g/L (Sigma, Cat. 5886, USA); azúcar mascabado, 1g/L (Bioxon, Cat. 150-1, México); con o sin agar bacteriológico 1.5% ó 0.8% (Bioxon, Cat. 134, México).

**Cuadro 5.** Características de las cepas de *L. monocytogenes* utilizadas.

<b>CEPA</b>	<b>FUENTE</b>	<b>ORIGEN</b>
<i>L. monocytogenes</i> Scott A	Alimento	Dr. Larry R. Beuchat, Universidad de Georgia
<i>L. monocytogenes</i> 19112	Humano	ATCC <sup>a</sup>
<i>L. monocytogenes</i> 7644	Humano	ATCC
<i>L. monocytogenes</i> 15313	Conejo	ATCC
<i>L. monocytogenes</i> SLCC 5764	Desconocido	Dr. Daniel Portnoy, Universidad de Pennsylvania
<i>L. monocytogenes</i> 1370	Mutante catalasa negativo	Dr. J. T. von Dissel, Suiza
<i>L. monocytogenes</i> 10403S	Ratón	Dr. Daniel Portnoy, Universidad de Pennsylvania

<sup>a</sup>ATCC: American Type Culture collection

Para la activación y cuenta de la población de las cepas de *L. monocytogenes* se utilizó el Caldo Soya Trypticaseína CST, (DB Bioxon, Cat. 210800, México) y Agar soya tripticaseína AST, (DB Bioxon, Cat. 211043, USA).

Para la producción de bacteriocinas mediante la cepa de *L. lactis* se utilizó el medio de cultivo a base de suero lácteo dulce suplementado. Los componentes de la suplementación de este medio, así como las concentraciones de los mismos se determinaron en base investigaciones previas, detalladas en la sección 5.4. La composición del suero lácteo (Melfran, Pensilvania, USA) en base seca fue de: 65% de lactosa, 11.5% de proteína, 0.5% grasa y 8.5 % de cenizas. La suplementación se realizó con: Extracto de levadura, EL, (Oxoid, Cat. L21, Inglaterra),  $MgSO_4$  (Sigma, Cat. M2643, USA);  $MnSO_4$  (Sigma, Cat. M7634, USA) y Tween 80 (Sigma, Cat. P4780, USA); las cantidades de estos componentes se describen en el Cuadro 6.

### **5.3 Ensayo de la actividad de bacteriocina. Difusión en agar.**

La actividad bacteriocinogénica de los ELC se determinó mediante la técnica de difusión en Agar (Bhunia y col., 1988). Se prepararon cajas petri con 10 ml de medio al 1% de agar y se colocó una sobrecapa de 8 ml de medio al 0.8% de agar previamente inoculado con el microorganismo indicador ( $10^6$  a  $10^7$  UFC/ml). Se dejó solidificar y se realizaron orificios de 0.4 mm con un horadador # 2 removiendo el agar. Se colocaron 20  $\mu$ l del ELC usando diluciones seriadas de dos en dos. Se incubaron las cajas a 30°C, durante 24 h. La actividad fue expresada en Unidades Arbitrarias por mililitro (UA/ml). Una unidad arbitraria es expresada como el recíproco de la dilución más alta que produjo una zona de inhibición de crecimiento del microorganismo indicador (Barefoot y Klaenhammer, 1983).

**Cuadro 6.** Concentraciones de los componentes del medio de cultivo a base de suero lácteo, para la producción de bacteriocinas de *L. lactis* UQ2

COMPONENTE	CONCENTRACIÓN	
Suero lácteo dulce (Melfran, Pensilvania, USA)	10 g/L	20 g/L
Extracto de Levadura (Oxoid)	10 g/L	20 g/L
MgSO <sub>4</sub> /MnSO <sub>4</sub> (Sigma)	(0.20/0.04) g/L	(0.5/0.1) g/L
Tween 80 (Sigma)	0.04g/L	0.2 g/L
Flujo de aire	0	248 ml/min

## 5.4 Producción de bacteriocinas.

Se ha demostrado en diversos estudios, que la composición del medio de cultivo tiene un efecto significativo en la producción de las bacteriocinas producidas por las BAL. El rendimiento de la producción de bacteriocinas se ha incrementado mediante la suplementación del medio de cultivo, con vitaminas, fuentes de nitrógeno (peptonas) y de carbono (azúcares). Los componentes del medio de cultivo que han demostrado tener un efecto importante en la producción de las bacteriocinas son el extracto de levadura, carbohidratos como glucosa, sales de magnesio y manganeso y Tween 80 (Nel y col., 2001). La suplementación de nutrientes en medios comerciales como el MRS, con extracto de levadura, glucosa y Tween 80, incrementaron eficazmente la producción de bacteriocinas producidas por *Lactobacillus brevis* OG1, sin embargo la adición de citrato de amonio, acetato de sodio y fosfato de magnesio no presentaron tener ningún efecto significativo en su producción (Ogunbanwo y col., 2003). Así también en la producción de pediocina ACH, se adicionó extracto de levadura y glucosa a los medios comerciales MRS y TGE y se obtuvo un aumento en su producción del 10% (Biswas y col., 1991), lactocina 705 (Vignolo y col., 1995).

Los carbohidratos son utilizados por los microorganismos como fuente de carbono, para, los cuales son metabolizados para el mantenimiento celular a través de la producción de ATP. Los microorganismos también requieren fuentes de nitrógeno, necesarios para la producción de purinas, pirimidinas y aminoácidos nitrogenados. Así como también recursos minerales como fosfatos, potasio, calcio, magnesio, manganeso, zinc, hierro y sulfato, éste último requerido para la biosíntesis de aminoácidos sulfurados. Micronutrientes inorgánicos, como iones de magnesio, manganeso, zinc, calcio y potasio son requeridos en pequeñas cantidades como cofactores enzimáticos (Weinberg, 1989; Rhodes y Stanbury, 1997).

De esta manera la determinación de los componentes para la suplementación del medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado fueron: extracto de levadura,  $MgSO_4/MnSO_4$  y Tween 80. En trabajos previos desarrollados en el laboratorio de

biotecnología de alimentos se estudio el efecto de la concentración de estos componentes en medios alternativos como el permeado se suero (Sánchez, 2003) y suero lácteo (Gómez, 2002) ambos en matraz agitado, durante la fermentación del *L. lactis* UQ2.

La producción de bacteriocinas fue llevada a cabo mediante la fermentación del *L. lactis* UQ2 en un medio de cultivo a base de suero lácteo a nivel de biorreactor. Se evaluó el efecto de cinco factores ambientales los cuales se muestran en el cuadro 6, así como los niveles determinados. Se utilizó un biorreactor (Applikon, Holanda, Mod Z61101C006) de 3 L el cual cuenta con un biocontrolador (ADI 1030), una bioconsola (ADI 1035) y un Programa BioXpert (versión 1.1) para la adquisición de datos por computadora.

Actualmente se ha recurrido al uso de herramientas estadísticas para aumentar el rendimiento en la producción de bacteriocinas, mediante la identificación de los componentes del medio de cultivo que presentan un efecto significativo en la producción de éstas bacteriocinas, presentando muy buenos resultados. En la producción de pediocina y nisina (Guerra y col., 2001) se empleó un diseño factoriales fraccionados, mediante el cual se logró incrementar la producción de éstas bacteriocinas. Li y col. (2002) utilizaron 6 factores para optimizar la producción de nisina, en un medio sintético, emplearon un diseño factorial fraccionado el cual fue muy efectivo como diseño de escrutinio para poder identificar los factores más importantes, que fueron: sacarosa, peptona de soya, extracto de levadura y  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Para la producción de nisina y pediocina en un medio alternativo a base de desperdicio de mejillones (Guerra y Pastrana, 2002a) se utilizó un diseño factorial con dos variables (fuente de carbono y nitrógeno) con dos niveles. Determinaron que la concentración de glucosa no afectó la producción de las bacteriocinas y la variable de respuesta fue determinada directamente de la actividad de bacteriocina mediante el método de fotométrico (Cabo y col., 1999).

Por lo que en éste estudio se empleo un diseño experimental factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con tres réplicas al centro, dando un total de 19 corridas, con un resolución V, en donde se pueden evaluar todos los efectos principales e interacciones dobles, la cual permite encontrar los factores relevantes en la producción de las bacteriocinas; de acuerdo a este diseño se determinaron las formulaciones para cada corrida de fermentación en el biorreactor. Se midió la actividad antimicrobiana como variable respuesta, mediante la técnica de difusión en agar.

La estrategia experimental llevada a cabo para encontrar los niveles de los factores del medio de cultivo, que presenten las mejores condiciones de producción de las bacteriocinas se muestra en la Figura 6.

Una vez determinados los factores significativamente relevantes, se determinaron mediante el modelo ajustando a los datos experimentales de los niveles de dichos factores que condujeran a la mejor variable de respuesta, es decir, las condiciones en las que se obtuvieran las mejores condiciones de producción de actividad antimicrobiana.

## **DISEÑO DE ESCRUTINIO**

### **Factores más relevantes**

Diseño factorial fraccionado,  $2^{5-1}$  con 3 puntos al centro con 19 corridas.

### **Factores:**

Flujo de oxígeno  
Suero lácteo en polvo  
Extracto de levadura  
Tween 80  
 $MgSO_4/MnSO_4$



## **DETERMINACIÓN DE LAS MEJORES CONDICIONES.**

Determinación de los niveles de los factores mas relevantes de acuerdo al diseño de escrutinio.



## **CORRIDA DE COMPROBACIÓN**

Fermentación del *L. lactis* con la formulación obtenida del diseño de escrutinio.

**Figura 6.** Estrategia Experimental. Para la obtención de las mejores condiciones de producción de bacteriocinas, de acuerdo al diseño de escrutinio  $2^{5-1}$ .

## **5.5 Corrida de comprobación.**

Una vez obtenidos los niveles de los factores con mayor influencia hacia una mejor actividad antimicrobiana, se realizó la corrida de comprobación, mediante la fermentación con *L. lactis* UQ2, utilizando la formulación del medio de cultivo obtenido del diseño estadístico. Se obtuvo el número de unidades formadoras de colonia, mediante la cuenta viable, determinándose también la concentración de azúcares reductores, perfil de pH y actividad antimicrobiana, utilizando como microorganismo indicador *M. luteu* (Estas técnicas se detallan más adelante).

## **5.6 Producción de bacteriocinas en medio comercial MRS.**

El medio de cultivo comercial más utilizado para la producción de bacteriocinas es el MRS, por lo cual se realizó la corrida de fermentación a nivel de biorreactor con este medio y se determinó durante el proceso fermentativo, la cuenta viable del *L. lactis* UQ2, así, como el perfil de pH y la actividad antimicrobiana del extracto libre de células (ELC) utilizando como microorganismo indicador el *M. luteus*.

## **5.7 Procedimiento para cuenta Viable.**

### **5.7.1 Técnica de Miles y Misra.**

En la técnica de Miles y Misra (ICMSF, 1978), se preparan cajas de agar con el medio correspondiente para cada microorganismo, vertiendo de 10 a 15 ml del medio y posteriormente se realizan diluciones de las muestras en diluyente de peptona al 0.1% y solución de fosfatos al 0.85% (pH 7), según corresponda. Se divide la caja petri con el medio en tres segmentos iguales (correspondiente a tres diluciones diferentes) y se colocan en cada zona 3 gotas de 20  $\mu$ l de la muestra. Se dejan secar, para su posterior incubación a la temperatura y tiempo adecuado para cada microorganismo analizado. Aunque la precisión y exactitud de este método es inferior al recuento en placa mediante vaciado o por extensión en superficie, permite una valoración rápida y aproximada de la cuenta viable.

### **5.7.2. Técnica de extensión en superficie.**

Se vierten en la caja petri de 10-15 ml del medio de cultivo correspondiente y se deja solidificar. Se realizan diluciones de la muestra con una solución de sales de fosfatos al 0.85% (pH 7) y se agregan 100  $\mu$ l de la dilución de la muestra en la caja petri, se extiende con una varilla acodada de vidrio y por último se incuba a 37 °C durante 24 h.

### **5.8 Determinación de proteína.**

La determinación de proteína se llevó a cabo mediante el método de Bradford utilizando el kit de BIO-RAD (Cat. 500-0114; Bradford, 1976). El reactivo de tinción se prepara diluyendo una parte de éste en 4 partes de agua destilada. Se remueven las partículas mediante filtración con un papel filtro (Whatman, #1). Se realiza una curva estándar con seroalbúmina bovina que contenga una concentración entre 200  $\mu$ g/ml y 1,400  $\mu$ g/ml. Se colocan 800  $\mu$ L de la muestra y 200  $\mu$ L del reactivo de Bradford en un tubo de ensaye, dejándolo reposar 10 min. Se lee la absorbancia a una longitud de onda de 595nm, usando un espectrofotómetro (Perkin Elmer, Lambda 40).

### **5.9 Determinación de azúcares.**

Para este análisis las muestras del suero suplementado fermentado, fueron centrifugadas (Eppendorf, Mod. 5804R) a 13000 x g durante 15 min a 4 °C, para eliminar las células, 2 ml de la muestra y 50  $\mu$ l de fenol al 80% fueron mezclados, posteriormente se añadió 5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Baker, Cat. 9681-02, México) dejándolos reposar 10 min, después se llevaron a un baño maría de 25-30 °C durante 10 a 20 minutos en agitación. Se leyó a una absorbancia a 490 nm. Se realizó una curva estándar con glucosa conteniendo entre 10 a 70 g/L del azúcar (Dubois y col., 1956).

### **5.10 Extracto libre de células (ELC).**

Las muestras se calentaron a 80°C por 30 minutos para evitar una posible inactivación de la bacteriocina por la acción de enzimas proteolíticas, posteriormente se separaron las células por centrifugación (Eppendorf 5804 R) a 13000 x *g* durante 15 min a 4° C (la pastilla obtenida de la centrifugación es utilizada para el EC). El sobrenadante obtenido se ajustó el pH a 6.5 con NaOH 1 M (Lewus y Montville, 1991), finalmente se esteriliza por filtración con membranas Millipore de 0.45 µm de diámetro de poro (Benkerroum y col., 1993).

Una vez obtenido el ELC del medio de cultivo obtenido al finalizar la fermentación, se deshidrató utilizando un secador por aspersion (Büchi, Suiza, Mod. B-191) a una temperatura de entrada de 180 °C y una temperatura de salida de 80°C.

### **5.11 Extracto de células (EC).**

La pastilla resultante de la centrifugación anterior, se resuspendió en 1 ml de HCl 0.02 N, se llevó a ebullición durante 10 min (Barrena-González y col., 1996) posteriormente centrifugándose a las mismas condiciones que el ELC. El sobrenadante se ajustó a pH de 6.5 y finalmente se esterilizó por filtración con membranas Millipore con un diámetro de poro de 0.45 µm.

### **5.12 Concentración mínima inhibitoria (CMI).**

Para la determinación de la CMI de las cepas de *L. monocytogenes* más sensible y más resistente encontradas. Se realizaron diluciones crecientes del ELC deshidratado en agua destilada estéril, se inoculó el medio CST a una concentración de 10<sup>3</sup> -10<sup>5</sup> UFC/ml con las cepas de *Listeria*. Los tubos se incubaron durante 18 y 24 hr a 37 °C. Se realizó la cuenta viable en ambos tiempos mediante la técnica extensión en superficie. Se utilizó como control negativo un tubo con medio CST inoculado con *Listeria*, sin la presencia del antimicrobiano.

### **5.13 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana.**

Se utilizaron las cepas de *L. monocytogenes* más resistente y más sensible. Las CMI's del ELC encontradas para cada una de las dos cepas de *Listeria* analizadas, se añadieron a series de tres tubos de ensaye, conteniendo 9 ml de medio CST. Los tubos de cada serie fueron ajustados a diferentes valores de pH (5, 6, 7 y 9) con soluciones de NaOH 1M y ácido cítrico 1M. Se inocularon los tubos con una población de  $10^4$  UFC/ml. Se tomaron muestras a 1, 2, 3, 5 y 7 h de incubación a 37°C, determinándose el recuento microbiano mediante la técnica de Miles y Misra. Se utilizó un tubo control sin la adición del ELC.

### **5.14 Biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A.**

#### **5.14.1 Preparación del inóculo.**

Los cultivos de trabajo de *L. monocytogenes* Scott A, se prepararon, inoculando 10 ml de CST (Oxoid) con 0.1 ml de un cultivo en fase estacionaria en tubos de ensaye incubados durante 18 h a 37°C, en agitación orbital (Lad-line, USA) a 100 rpm, posteriormente se almacenaron a -20°C. Antes de cada experimento, se inocularon 100 µl de este cultivo en 10 ml de CST, incubándose durante 18 h a 37 °C, 10 ml de este cultivo, se inocularon en 90 ml de CST incubándose durante 18 h a 37° C. Posteriormente se centrifugó el cultivo a 10,000 x *g* a 4°C, 10 min. Finalmente se removió el líquido y se resuspendió la pastilla con 100 ml de solución salina 0.85%.

#### **5.14.2 Preparación de las placas de acero inoxidable.**

Las placas de acero inoxidable (tipo 304L, No. 4) de dimensiones de 2.54 cm por x 2.54 cm de longitud por lado, teniendo un área total de 6.45 cm<sup>2</sup> fueron utilizados como superficie para la formación de las biopelículas producidas por *L. monocytogenes*. Las placas se colocaron dentro de cajas petri de vidrio esterilizadas a 121°C durante 15 min, posteriormente se tallaron con una solución caliente de detergente (Alconox, USA) para

remover cualquier residuo, después se lavaron con agua destilada para remover el detergente. Las placas se esterilizaron nuevamente dentro de las cajas de vidrio, dejándose secar durante la noche en un desecador (Moltz y Martin, 2005).

#### **5.14.3 Formación de las biopelículas.**

Se utilizó una modificación del método desarrollado por Robbins (2000), para la adhesión y desarrollo de la biopelícula. En las placas de acero inoxidable, se colocaron 0.1 ml del cultivo, difundándose el inóculo en toda la superficie de la placa, con una asa estéril, se dejó incubar 3 h, 20°C para permitir la adherencia a la superficie del metal. Se lavan las placas con 10 ml de una solución amortiguadora de fosfato de potasio (50 mM, ajustado a pH 7), aplicando sobre la superficie inoculada, manteniéndose sujeta a placa con unas pinzas en un ángulo de 45°. Posteriormente se escurrió el líquido sobrante y se regresó la placa a la caja petri.

#### **5.14.4 Alimentación de la biopelícula.**

Después de cada lavado con la solución amortiguadora de fosfatos, se colocaron 0.2 ml de CST en cada placa (la tensión superficial de la humedad de la placa, permite la distribución uniforme del CST), dejándose en el desecador al 100 % de humedad relativa por 24 h, evitándose la evaporación del medio. Después de 24 h se lavaron las placas nuevamente con la solución amortiguadora de fosfatos. Se repitió este procedimiento durante 5 días.

#### **5.14.5 Adición del antimicrobiano a las biopelículas de *L. monocytogenes*.**

Una vez formada la biopelícula, se añadieron 0.2 ml de diferentes concentraciones del ELC deshidratado, partiendo de la CMI encontrada para la *Listeria* más resistente. Después de la adición del ELC, se colocaron las placas en el desecador a 100% de humedad relativa dejándose reposar durante 24 h. Cada experimento se realizó por triplicado, dejando una placa sin tratamiento, para usarse como control (sin la adición del ELC).

#### **5.14.6 Remoción de *L. monocytogenes* adherida a las placas de acero inoxidable.**

El ensayo cuantitativo para la cuenta viable de *L. monocytogenes* en la superficie de las placas fue realizado por frotis. Se utilizaron hisopos esterilizados a 121°C durante 5 min. Para cada placa, se utilizó un hisopo distinto, el cual se talló vigorosamente en la superficie, posteriormente se colocaron los hisopos en tubos de ensaye conteniendo 10 ml de solución salina estéril al 0.85%. Se agitaron durante 1 min y se realizó la cuenta viable por extensión en superficie por triplicado. Los resultados se reportaron como UFC/placa.

#### **5.15 Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Para la identificación de las bacteriocinas presentes en el EC, se realizó una electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida, usando el sistema Tris-Tricina (Schägger and Jagow, 1987). El gel de alineamiento fue al 49.5% T y 3 %C (% de la mezcla archilamida/bisacrilamida) y para el gel separador 49.5%T y 3%C. Los marcadores de peso molecular (Bio-rad, Cat 161-0326) se diluyeron 1:20 en la solución amortiguadora Tris-Tricina, con mercaptoetanol, para posteriormente ser calentados a 95°C durante 5 min. Las muestras se diluyeron 1:4 en solución amortiguadora Tris-Tricina, se calentaron a 90°C, 4 min. Se inyectaron 20 µl de cada muestra, en los carriles del gel de poliacrilamida. Se realizó la corrida a voltaje constante, primero 1h a 30 V para el alineamiento de los carriles y posteriormente cuando las muestras llegan al gel de separación, se incrementó a 150 V hasta terminar la corrida (aproximadamente 2 h). Los geles se tiñeron con azul de Coomassie G-250.

##### **5.15.1 Zimograma.**

Para determinar el efecto antimicrobiano del EC, se cortaron bandas del gel de poliacrilamida. Las bandas obtenidas en lugar de teñirse con azul de Coomassie para evitar se lavaron repetidamente (5 veces) con agua estéril. Para determinar la actividad de las bandas del gel electroforético, se utilizaron, tanto la técnica de difusión en agar, como el método en medio líquido.

Para la técnica de difusión en agar (sección 5.3), se utilizó como microorganismo indicador al *M. Luteus NCIB 8166*, las bandas del gel se colocaron en la caja petri, inoculada previamente con  $1 \times 10^7$  UFC/ml con el microorganismo indicador. Se añadieron 16 ml del medio Assay, para cubrir completamente las bandas del gel, se dejó incubar durante 24 h a 30°C.

Para la técnica en medio líquido se utilizó a la cepa de *L. monocytogenes* Scott A, como microorganismo indicador. Las bandas obtenidas en la electroforesis, se colocaron dentro de tubos con tapón de rosca con 5 ml de CST (caldo soya tripicaseína). Previamente se inocularon los tubos con *L. monocytogenes* Scott A con una población de  $1 \times 10^5$  UFC/ml. Los tubos se incubaron durante 18 h a 37°C.

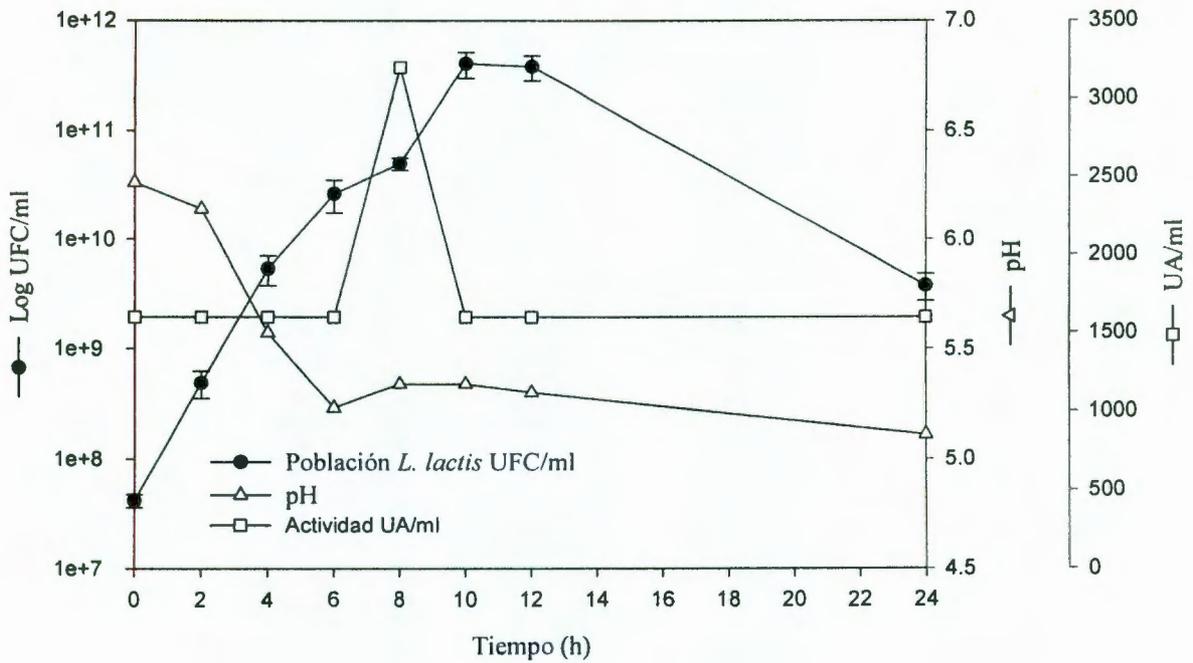
## 6. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 6.1 Crecimiento de *Lactococcus lactis* UQ2 en suero lácteo suplementado.

Se realizaron estudios preliminares (Sandoval y col., 2003), en el Laboratorio de Biotecnología de alimentos, de la Universidad Autónoma de Querétaro. Se evaluó el crecimiento de *L. lactis* UQ2 a nivel de matraz agitado utilizando suero lácteo suplementado, para determinar las condiciones de activación de la cepa, para su posterior escalamiento a nivel de biorreactor.

La etapa de crecimiento exponencial de *L. lactis* UQ2 en agitador orbital (Figura 7), se observó desde el inicio hasta aproximadamente las 12 h, siendo las 8 h donde se obtuvo un máximo de producción en el extracto de bacteriocinas de 3200 UA/ml. De acuerdo a esto, la activación de la cepa de *L. lactis* para cada una de las corridas en el biorreactor se realizó inoculando el 1% del microorganismo en 10 y 20 ml del medio a base de suero lácteo para el primer y segundo semilleo respectivamente, incubándolo 12 h a 30 °C, a 100 rpm, tomando en cuenta que el microorganismo pasa de un medio de cultivo a otro diferente, se decidió activarlo hasta tiempos de incubación más largos, dentro de la fase estacionaria, para evitar el riesgo de una falta de adaptación al medio de suero suplementado.

De acuerdo a Gómez (2002), las mejores condiciones encontradas en matraz agitado no representan las mejores condiciones a nivel de biorreactor, por lo que es necesario realizar los estudios correspondientes en el biorreactor para determinar las mejores condiciones de producción de bacteriocinas.

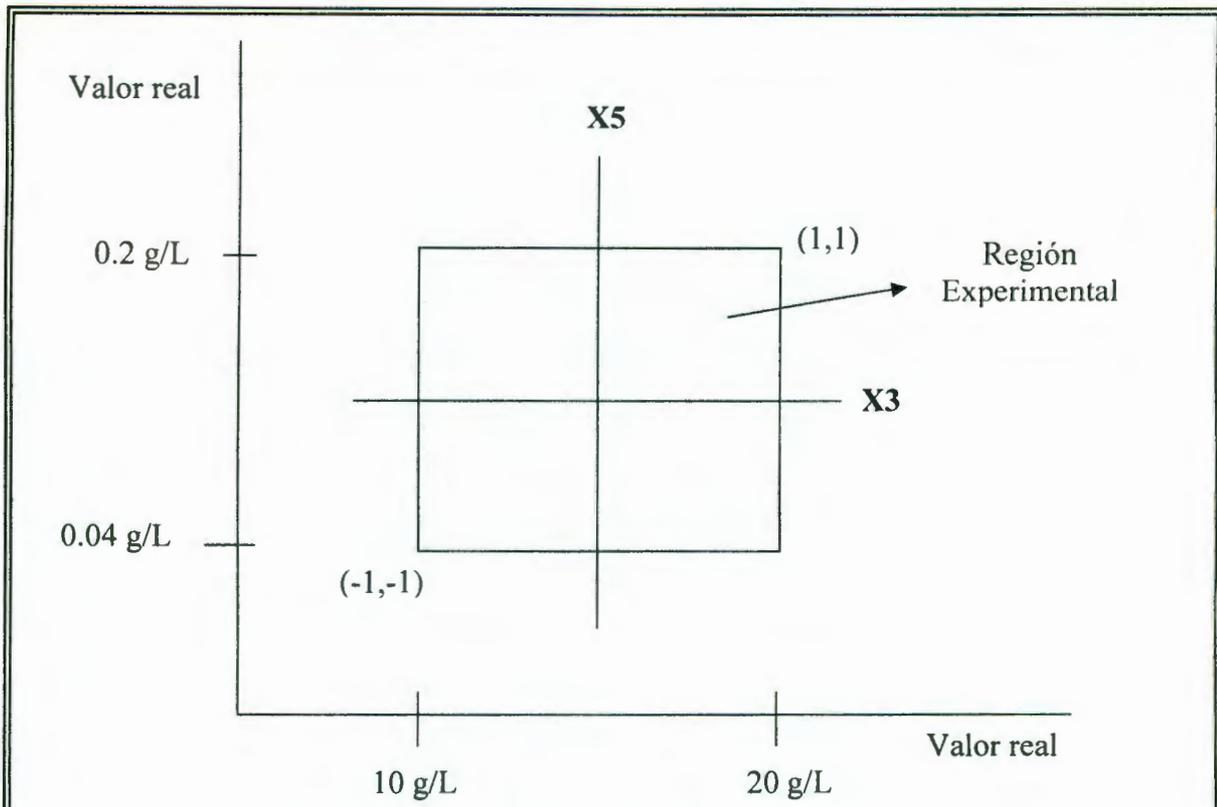


**Figura 7.** Crecimiento de *L. lactis* en suero lácteo suplementado en agitador orbital. (Suero lácteo, 20 g/L; extracto de levadura, 15 g/L;  $MnSO_4/MgSO_4$ , (0.35/0.07 g/L); Tween 80 al 0.1%) a 30°C y 200 rpm.

## 6.2 Escrutinio de las mejores condiciones de producción de bacteriocinas por *L. lactis* UQ2 a nivel de bioreactor.

Se empleó un diseño factorial fraccionado de  $2^{5-1}$  completamente aleatorizado, con tres réplicas al centro, para poder localizar los factores que presentaron un tener un efecto significativo en la producción de las bacteriocinas, denominado diseño de escrutinio. Para poder analizar de una manera práctica el diseño estadístico, se pasa de una región de operación real a una región experimental codificada. En la figura 8, se muestra gráficamente la codificación de los valores en la región experimental. Se realizaron 19 corridas experimentales, en donde se realizó la fermentación del *L. lactis* UQ2 a nivel de biorreactor en 0.9 L. de medio de cultivo de suero lácteo suplementado. Las formulaciones del medio de cultivo para cada corrida fueron determinadas de acuerdo al diseño factorial fraccionado. Cada fermentación fue desarrollada a una temperatura constante de 30°C a 200 rpm, durante 24 h. Se tomaron muestras cada 2 h. Para cada corrida de fermentación se obtuvo el perfil de actividad de bacteriocina de acuerdo al método de difusión en agar, utilizando como microorganismo indicador el *M. luteus* en UA/ml, así como el perfil del pH.

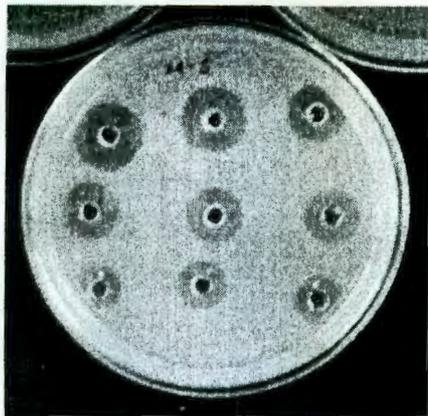
La actividad de bacteriocina se tomo como variable respuesta. Sin embargo de acuerdo a García-Almendárez y col., (2002), quienes utilizaron un diseño estadístico para optimizar la producción de bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* la medición de la actividad de bacteriocina se modificó para expresarla en unidades arbitrarias modificadas, tomando en cuenta la substracción del diámetro de inhibición inicial, menos el diámetro de inhibición de inhibición causado por la dilución más alta, multiplicado por la dilución. El uso de estas unidades arbitrarias modificadas permitió el modelamiento de las condiciones del medio de cultivo que condujeran a un óptimo en la producción de las bacteriocinas del *L. plantarum*.



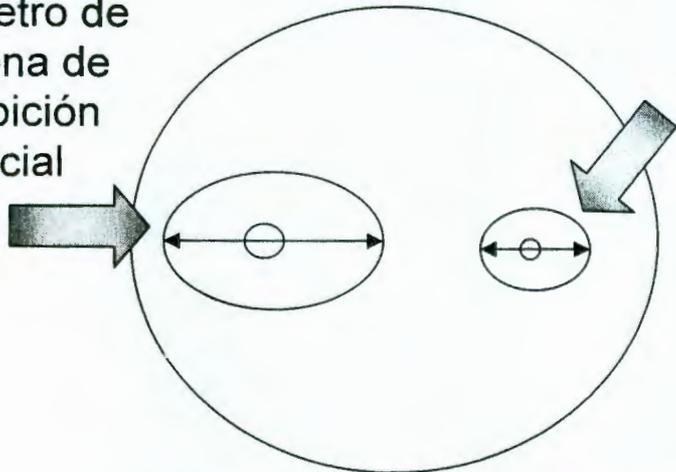
Factor	Nivel alto (1)	Nivel bajo (-1)
<b>X1: Flujo de aire</b>	0 ml/min	248 ml/min
<b>X2: Suero lácteo</b>	10g/L	20g/L
<b>X3: Extracto de levadura</b>	10 g/L	20g/L
<b>X4: MgSO<sub>4</sub>/MnSO<sub>4</sub></b>	(0.2/0.04)g/L	(0.5/0.1)g/L
<b>X5: Tween 80</b>	0.04g/L	0.2 g/L

-1 y +1 son los valores codificados  $x_{kl} = \frac{X_{kl} - X_{mk}}{\{1/2 (max_l (X_{kl}) - min_l (X_{kl}))\}}$  donde  $k = 1, 2$  representa el factor, y  $l = 1, 2$  el nivel del factor, el valor codificado se denota por la letra minúscula ( $k, l$ ) y  $X_m$  es el promedio del valor real de cada factor.

**Figura 8.** Codificación de los valores reales de operación en la región experimental.



Diámetro de la zona de inhibición inicial



Diámetro de la zona de inhibición de la última dilución

**Figura 9.** Medición de las zonas de inhibición en la técnica de difusión en agar.

Se analizaron diferentes modificaciones a la variable de respuesta, considerando lograr un mayor rendimiento en la actividad de bacteriocina, sin embargo el modelo anteriormente detallado fue el que representó la mejor opción. En la sección de anexos se detallan estos modelos.

Los niveles de los factores para cada corrida se muestran en el Cuadro 7, el orden de las corridas de acuerdo al diseño estadístico factorial fraccionado y el valor de la actividad antimicrobiana modificada.

Los datos obtenidos de cada corrida de fermentación fueron analizados mediante el análisis de varianza (ANOVA) del diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$  con tres réplicas al centro. De acuerdo al Cuadro 8, solamente el flujo de aire no fue significativo ( $p=0.43$ ).

El suero lácteo, el extracto de levadura, las sales ( $MgSO_4/MnSO_4$ ) y el Tween 80 fueron los factores, que tuvieron un efecto significativo en la actividad antimicrobiana. La influencia de estos factores en la composición del medio de cultivo para la producción de diversas bacteriocinas, ha sido reportada. Tal es el caso de la producción de bacteriocinas de *L. lactis* ATCC 11454 (Li y col., 2002), en donde se encontró, que la peptona de soya, y el  $KH_2PO_4$ , tuvieron un efecto significativo para la producción de éstas. En la producción de enterocina 1146 el extracto de levadura, pH y el Tween 80 afectaron significativamente la actividad de esta bacteriocina (Parente and Hill, 1992).

**Cuadro 7.** Diseño  $2^{5-1}$  con tres puntos al centro y valores de la actividad modificada.

Orden	X4	X3	X2	X1	X5	AM
1	-1	-1	-1	-1	1	3.54
2	1	-1	-1	-1	-1	4.6
3	-1	1	-1	-1	-1	2.67
4	1	1	-1	-1	1	3.68
5	-1	-1	1	-1	-1	3.05
6	1	-1	1	-1	1	3.45
7	-1	1	1	-1	1	3.62
8	1	1	1	-1	-1	3.58
9	-1	-1	-1	1	-1	2.51
10	1	-1	-1	1	1	9.5
11	-1	1	-1	1	1	2.4
12	1	1	-1	1	-1	2.7
13	-1	-1	1	1	1	3.03
14	1	-1	1	1	-1	3.45
15	-1	1	1	1	-1	2.46
16	1	1	1	1	1	3.51
17	0	0	0	0	0	3.07
18	0	0	0	0	0	3.28
19	0	0	0	0	0	3.28

X<sub>1</sub>: Flujo de aire (ml/h); X<sub>2</sub>: Suero dulce (g/L); X<sub>3</sub>: Extracto de levadura (g/L); X<sub>4</sub>: MgSO<sub>4</sub>/MnSO<sub>4</sub> (g/L); X<sub>5</sub>: Tween 80 (%); AM: Actividad antimicrobiana modificada.

**Cuadro 8.** Análisis de varianza (ANOVA) para el diseño factorial fraccionado  $2^{5-1}$ .

Factor	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Valor de F calculada	Valor-p
<b>X1: Flujo de aire</b>	<b>0.117306</b>	<b>1</b>	<b>0.81</b>	<b>0.4334*</b>
X2: Suero dulce	1.85641	1	12.88	0.0370
X3: Extracto de levadura	4.52626	1	31.41	0.0112
X4: MgSO <sub>4</sub> /MnSO <sub>4</sub>	7.82601	1	54.30	0.0052
X5: Tween 80	3.71526	1	25.78	0.0114
X1X5	3.00156	1	20.83	0.0197
X1X3	2.50431	1	17.38	0.0251
X1X4	2.50431	1	17.38	0.0251
X1X2	0.936056	1	6.50	0.0840
X2X3	4.93951	1	34.27	0.0099
X2X4	3.54381	1	24.59	0.0157
X2X5	1.93906	1	13.45	0.0350
X3X4	2.68141	1	18.61	0.0229
X3X5	1.05576	1	7.33	0.0734
X4X5	0.955506	1	6.63	0.0821
Error total	0.432348	3	-	-
Total	42.5348	18	-	-

 $R^2 = 0.9889$ 

\* factor no significativo al 0.55%

Se obtuvo también el diagrama de Pareto, como se observa en la figura 10a donde se puede observar gráficamente los efectos principales y de interacción, así como el nivel codificado de cada uno de los factores que presentan el mayor efecto significativo de la variable de respuesta modificada (AM). Una mayor área en la gráfica de barras indica un mayor efecto del factor en la variable de respuesta; cuando la barra se encuentra a la derecha de la gráfica habrá un efecto hacia el nivel +1. De esta manera puede observarse que el flujo de oxígeno presenta un pequeño efecto en la variable de respuesta modificada, con una ligera tendencia hacia el nivel +1; de acuerdo con la última columna de la figura 10a este efecto no es significativo. En la figura 10b se ejemplifica una gráfica de interacción entre los factores X4 y X1, donde se puede observar que existe un efecto de interacción entre ambos factores mostrando una tendencia hacia el nivel +1, hacia un valor de la AM de 0.4, lo cual se comprueba en la gráfica de Pareto (Figura 10a).

En la figura 11, se muestran todas las interacciones entre los factores analizados, las cuales muestran una concordancia en la tendencia del nivel de cada interacción con el diagrama de Pareto.

De acuerdo a la máxima deseabilidad (deseabilidad=1) de la variable respuesta modificada AM, se obtiene teóricamente la mayor producción de bacteriocina. Los niveles de los factores codificados en el valor máximo deseado de la variable respuesta que es alrededor de 9.4, se muestran en figura 12. Estos valores se obtuvieron de acuerdo al software JMP4.

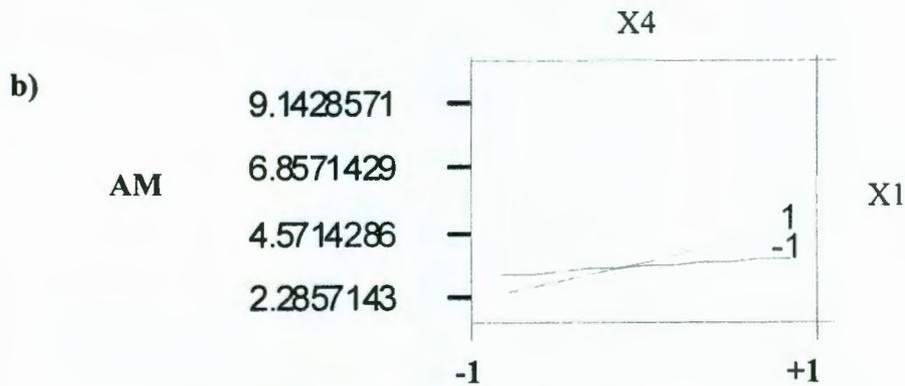
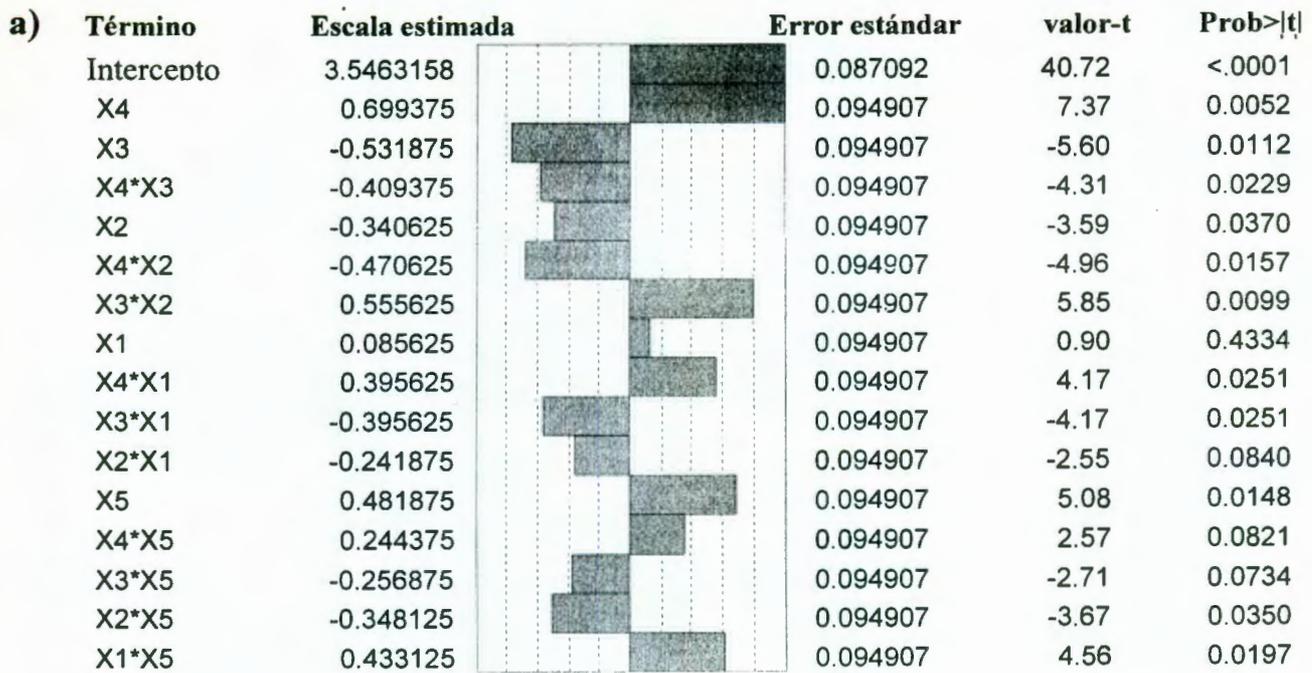


Figura 10. Diagrama de Pareto (a) y gráfica del efecto de interacción (b).

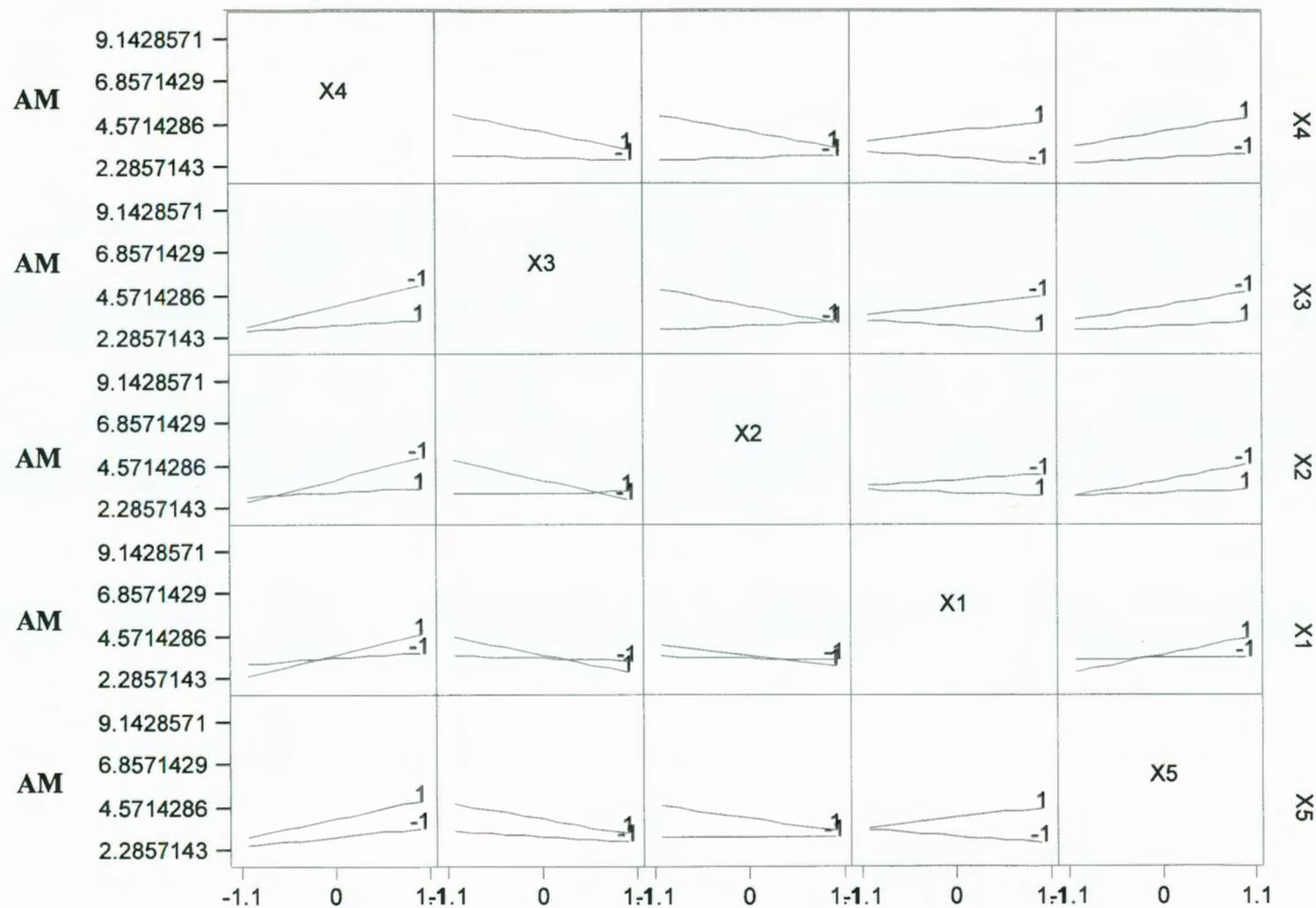


Figura 11. Efecto de interacciones dobles de acuerdo al diseño  $2^{5-1}$

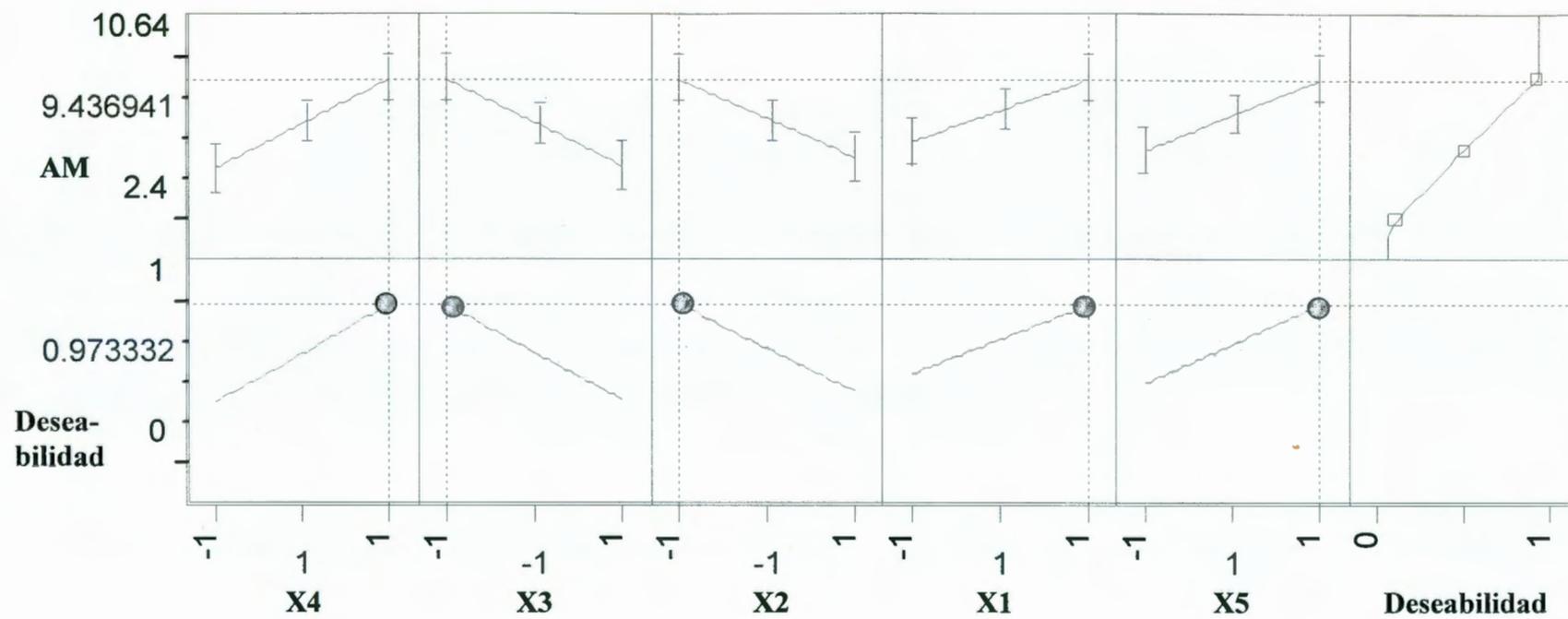
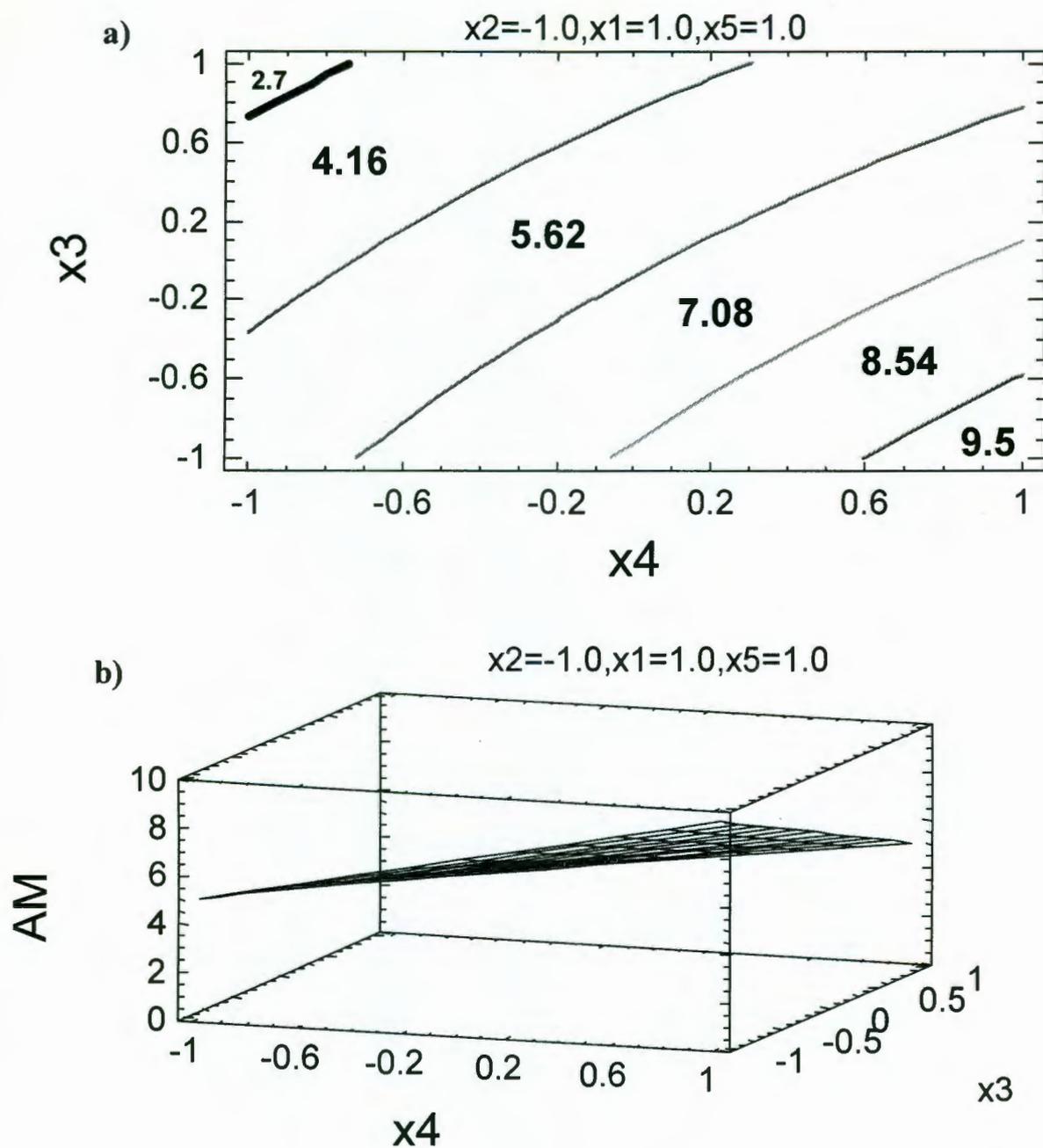


Figura 12. Deseabilidad de la variable modificada de respuesta

Para poder observar de una manera global la tendencia del efecto de los factores en la variable respuesta modificada, es necesario obtener una gráfica de curvas de nivel (figura 13a) en la cual se fijaron los factores X1, X2 y X5 de acuerdo a los resultados de deseabilidad; estos mismos resultados se pueden observar en la gráfica de superficie de respuesta (figura 13b). En este tipo de gráficas se observa la tendencia de los factores X3: Extracto de levadura y X4:  $MgSO_4/MnSO_4$ , en los que se obtiene el mayor valor de la AM.

En el cuadro 9, se muestran los valores de los niveles de los factores determinados en donde teóricamente se obtuvo el máximo valor de la AM.

El efecto significativo de estos factores ha sido reportado. Liu y col., 2003, estudiaron los factores que influyen la nisina producida por *L. lactis* en un medio a base de suero lácteo, en donde utilizaron un diseño estadístico, en el cual se encontró que la máxima producción de la nisina fue obtenida cuando el extracto de levadura tuvo un valor de 12.067g/L, el  $KH_2PO_4$  de 0.569 g/L y el  $MgSO_4$  fue de 0.572 g/L. Los factores que no presentaron efecto significativo fueron el pH, Temperatura, Tween 80 y la polipeptona. Los experimentos se llevaron en condiciones aeróbicas. Estos valores son similares a los obtenidos en este trabajo.



**Figura 13.** Curvas de nivel de la variable respuesta AM estimada (a). Superficie de respuesta estimada (b). De los factores X4:  $MgSO_4/MnSO_4$  y X3: Extracto de Levadura.

**Cuadro 9.** Niveles de los factores obtenidos para las mejores condiciones de producción de bacteriocinas, de acuerdo al diseño de escrutinio  $2^{5-1}$ .

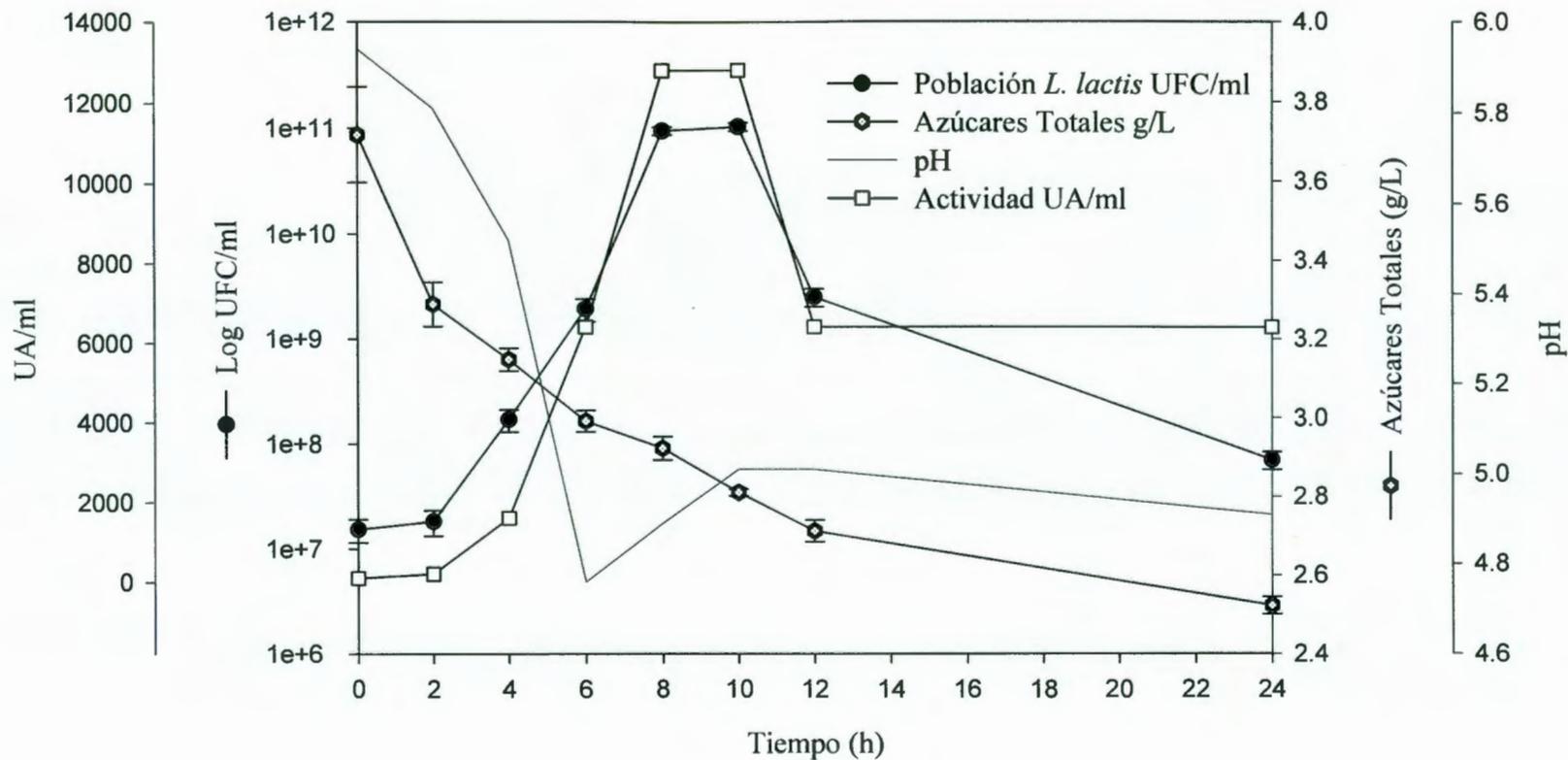
<b>Compuesto</b>	<b>Factor</b>	<b>Nivel</b>	<b>Cantidad</b>
Flujo de aire	X1	+1	248 ml/min
Suero lácteo	X2	-1	10 g/L
Extracto de levadura	X3	-1	10 g/L
MgSO <sub>4</sub> /MnSO <sub>4</sub>	X4	+1	(0.5/0.1) g/L
Tween 80	X5	+1	0.2%

### **6.3 Producción del extracto de bacteriocinas en las mejores condiciones obtenidas de acuerdo al diseño de escrutinio.**

La corrida de comprobación fue llevada a cabo de acuerdo a la formulación del medio de cultivo obtenida de acuerdo al diseño de escrutinio, anteriormente detallado. En la Figura 14, se presentan gráficamente los valores de actividad de bacteriocina, pH, población, contenido de carbohidratos y proteína contra el tiempo de fermentación. La máxima producción de bacteriocina fue de 12,800 UA/ml, el tiempo de fermentación se desarrolló en 8 h, con un valor de pH 4.9, población del *L. lactis*  $1 \times 10^{10}$  UFC/ml, consumo de carbohidratos alrededor del 23% de los carbohidratos iniciales y por último el contenido de proteína aumentó cerca del 50% del contenido inicial, estos valores están dados en el punto donde se determinó la máxima actividad bacteriocinogénica.

Se observa en la figura 14, que después de alcanzar la máxima producción de bacteriocina en el medio de suero lácteo suplementado, ocurre una drástica disminución de la bacteriocina soluble. Este proceso generalmente ha sido observado en diversos estudios y puede ser debido a la inactivación proteolítica (Joerger y Klaenhammer, 1986), agregación de las moléculas de bacteriocina (De Vuyst y col., 1996) y la adsorción de las bacteriocinas a la superficie celular del microorganismo productor (Yang y col. 1992; Parente y Ricciardi, 1994; Parente y col., 1997).

Se ha observado este mismo fenómeno en la producción por fermentación de diversas bacteriocinas. Durante la fermentación por lote de *L. amylovorus* DCE 475, se observó un rápido decrecimiento en la actividad de bacteriocina después de la fase de su producción de bacteriocina asociada al crecimiento (De Vuyst y col, 1996; Lejeune, y col., 1998). Esta disminución de la actividad está asociada con el consumo de la fuente de energía, glucosa, que disminuye considerablemente al final de la fermentación.



**Figura 14.** Gráfica de la fermentación de *L. lactis*, de acuerdo a la formulación determinada mediante el diseño de escrutinio. Mejores condiciones de producción de bacteriocina. Consumo de carbohidratos g/L (medido como glucosa), Actividad antimicrobiana (UA/ml).

En la figura 14, se puede observar que la producción de bacteriocinas se clasifica cinéticamente como un metabolito primario asociado parcialmente al crecimiento, ya que se empieza a sintetizar desde el inicio de la fermentación y está asociada al crecimiento del *L. lactis*. Otras bacteriocinas han sido reportadas cinéticamente como metabolitos primarios tal como nisina y pediocina (Guerra y Pastrana, 2002b). La síntesis de nisina decrece cuando el pH del medio disminuye a menos de 4. En estudios realizados por Li y col, (2002), se encontró que la máxima producción de biomasa celular no necesariamente resulta la mas alta producción de nisina.

Estudios realizados en la producción de bacteriocinas por *L. lactis* subs. *lactis* CECT 539 y *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 en concentrado de suero, se demostró que la producción de nisina, presentó un comportamiento de metabolito primario. Su producción fue inhibida por el incremento de nitrógeno, fósforo y concentración de azúcar en el medio de cultivo (Guerra y col., 2001). La máxima producción de biomasa y de la bacteriocina fue a las 12 h. En general la producción de bacteriocinas muestra ser metabolitos primarios, en las cuales la velocidad de producción de éstas, es paralela con la velocidad de crecimiento de la su cepa productora. Sin embargo existen varios factores que pueden afectar la síntesis de éstas, tal como la composición del medio de cultivo (carbohidratos, nitrógeno, minerales, etc) y las condiciones de fermentación (pH y temperatura).

A su vez en la Figura 14, se observa que la concentración de azúcares totales que puede verse como un índice del consumo de sustrato, se fue agotando al pasar el tiempo de fermentación, a su vez se observa un aumento en la población del *L. lactis*, indicando que los carbohidratos presentes en el medio de cultivo son una buena fuente de carbono para la biosíntesis celular.

Estudios realizados en la producción de bacteriocinas producidas por *L. lactis* subsp. *lactis* y *Pediococcus acidilactici* en un medio de cultivo a base de desperdicio de mejillones, se observó también una disminución de los azúcares totales, de 0.65g/L a 0.38 g/L (59%) en 18 h de fermentación (Guerra y Pastranaa, 2002).

Generalmente el tiempo de fermentación, en donde se obtiene la máxima producción de bacteriocinas, es mayor a las 10 horas, tal es como se observa en la producción de pediocina en medio TGE a las 14 h, la producción de sakacina en el mismo medio a las 10 h de fermentación (Yang y Ray, 1994).

Estudios realizados sobre las características metabólicas del *L. lactis* demostraron que la adición de oxígeno al medio de cultivo, incrementa el rendimiento de biomasa celular, 10% más en comparación con el análisis realizado en condiciones anaeróbicas, encontrándose también un importante impacto en la actividad de enzimas catabólicas. Se confirmó que la adición de oxígeno al medio, presentó un impacto negativo, en la síntesis del piruvato, regulando las enzimas alcohol-deshidrogenasa, incrementando la actividad de la piruvato deshidrogenasa,  $\alpha$ -acetolactato deshidrogenasa, y las NADH oxidasas (Jensen y col., 2001)

La tolerancia al oxígeno, del *L. lactis* puede conseguirse, adicionando sulfato de manganeso al medio de fermentación, ya que la acumulación de  $Mn^{2+}$  en el medio actúa como una superóxido dismutasa, que es la enzima que metaboliza al oxígeno.

La adición de surfactantes al medio de cultivo, tales como Nonidet P-40, SDS y Tween en la producción de bacteriocinas han demostrado el incremento en su producción, como se demostró en la producción de lactacina F, al adicionar tween 80, se logró un incremento en la producción en un 400% (Muriana y Klaenhammer, 1991). Esto se ha atribuido al efecto dispersante de agregados de la bacteriocina entre ellas mismas o con las paredes del recipiente. La actividad de lactococcina G producida por *L. lactis* aumentó 10 veces, al añadirse Tween 80 en el medio de cultivo. Se ha encontrado que la presencia de Tween 80 en concentraciones mayores a 0.01%, disminuye la actividad de la pediocina A y lactocina S (Piva y Headon, 1994); aunque en la producción de bacteriocinas producidas por *L. lactis* subsp. *lactis* B14 ante la presencia de Tween al 1%, no se encontró un cambio significativo en la producción de éstas bacteriocinas. Sin embargo se han desarrollado estudios en donde a bajas concentraciones de Tween, menores de 2 g/L se observa un

efecto significativo en la actividad de bacteriocinas, como la enterocina 1146 y lactococcina D (Parente y Hill, 1992).

Este incremento en la actividad de bacteriocina, puede atribuirse al efecto del Tween a formar micelas con las proteínas del medio de cultivo, estabilizando de esta manera la actividad de las bacteriocinas.

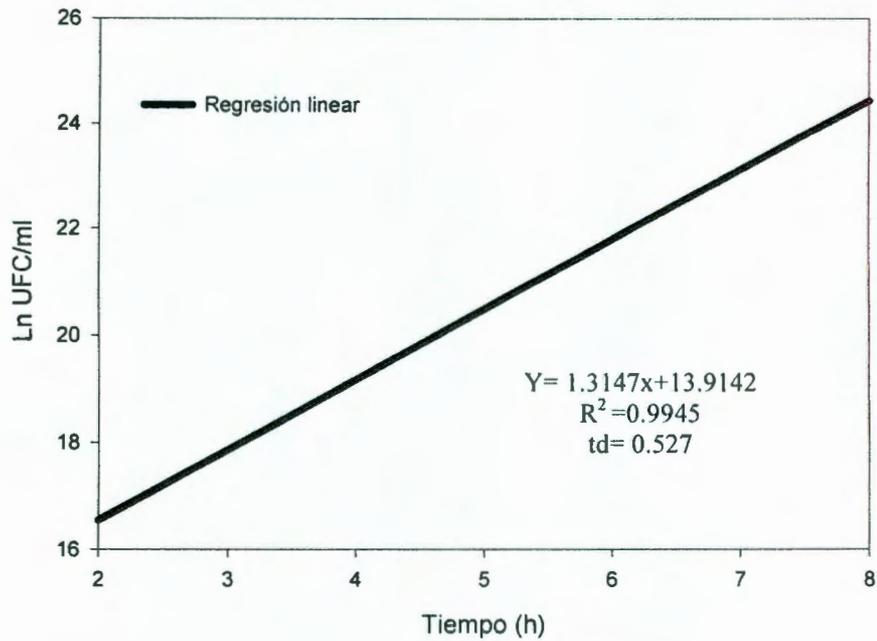
#### **6.4 Tiempo de duplicación.**

Se determino la velocidad específica de crecimiento (Monod, 1949). En la Figura 15, se observa gráficamente el cálculo tanto del tiempo de duplicación, como de la velocidad específica de crecimiento, mediante la ecuación de Monod, se determinó el tiempo de duplicación de 0.527 h, mientras que la velocidad específica de crecimiento fue de  $1.31 \text{ h}^{-1}$ .

La producción de las bacteriocinas generalmente esta relacionada con el crecimiento bacterial, implicando una dependencia en el volumen de producción de bacteriocina con la biomasa total formada (De Vuyst y Vandadmme, 1992; Møortvedt-Abildgaard, y col., 1995 y De Vuyst, 1995).

#### **6.5 Comparación de la fermentación efectuada en las mejores condiciones de producción obtenidas según el diseño de escrutinio, usando el medio comercial MRS.**

El medio comercial MRS es el medio de cultivo más utilizado para la producción de bacteriocinas, tal como la lactococcina K (Seuk-Hyun y Ahn, 2000; Onda y col., 2002); así como bacteriocinas de *L. lactis* (Cai y col., 1997; Ivanova, y col., 2000). Debido a su amplia actividad antimicrobiana, asociada a la producción de bacteriocinas, se decidió utilizar éste medio para realizar la comparación de la producción de bacteriocinas en un medio comercial contra el medio de suero lácteo suplementado. En el Cuadro 10, se observa la formulación de este medio (De Man y Rogosa, 1960).



**Figura 15.** Determinación gráfica, de la velocidad específica de crecimiento. Mediante el método de Monod. Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) =  $1.3147 \text{ h}^{-1}$ . Tiempo de duplicación ( $td$ ) =  $0.527 \text{ h}$

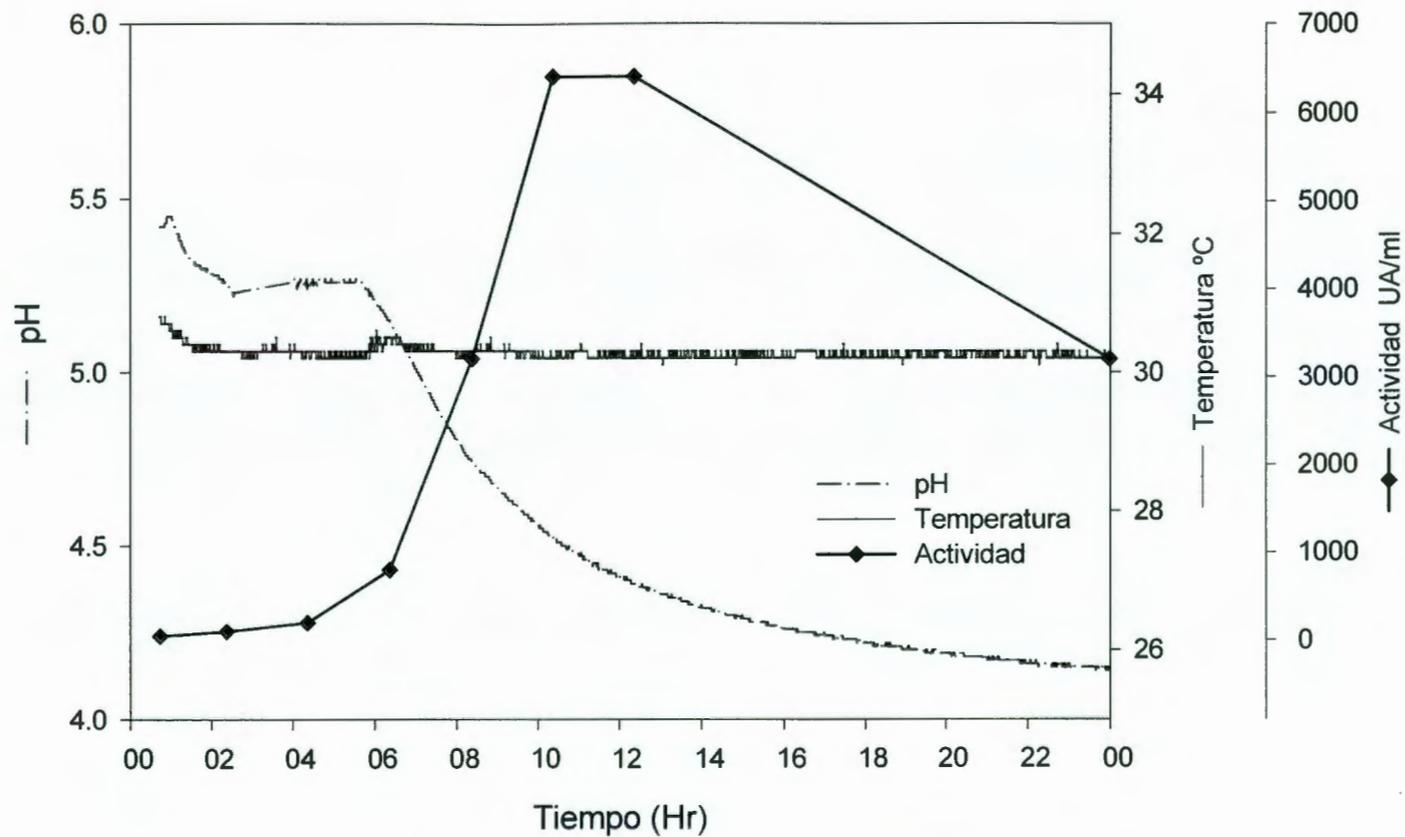
**Cuadro 10.** Composición del medio de cultivo comercial MRS

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Fosfato hidrógeno dipotásico	2 g/L
Glucosa	20 g/L
Sulfato de Magnesio heptahidratado	0.2 g/L
Sulfato de Manganeso tetrahidratado	0.05 g/L
Extracto de carne	8 g/L
Peptona	10 g/L
Acetato de sodio Trihidratado	5 g/L
Citrato triámonico	2 g/L
Extracto de levadura	4 g/L

En la Figura 16, se observa cinética de producción de bacteriocinas mediante la fermentación del *L lactis* UQ2 a nivel de biorreactor utilizando el medio comercial MRS, en donde el máximo título de actividad de bacteriocina durante el proceso de fermentación fue de 6400 UA/ml a un tiempo de 10 horas. La actividad de bacteriocinas, en este medio, fue menor a la desarrollada en el medio a base de suero lácteo suplementado, mientras que el tiempo de fermentación en el cual se encontró la máxima actividad de bacteriocina, fué mayor al registrado en la corrida de suero lácteo suplementado, obtenida del diseño estadístico de escrutinio.

En estudios realizados para la producción de pediocina por *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 en suero lácteo, la producción de bacteriocina fue menor a los obtenidos en el medio MRS (Guerra y Pastrana, 2002b).

El máximo valor de la actividad de bacteriocina en el medio de suero suplementado fue dos veces mayor que el encontrado en el medio MRS. Aunque la máxima producción de bacteriocina fue encontrada a las 8 h de fermentación al igual que en el medio de suero lácteo suplementado, no se logró obtener los mismos rendimientos de producción de bacteriocina. El valor de pH en la máxima actividad de bacteriocina para ambos casos es alrededor de 4.5



**Figura 16.** Cinética de Producción de bacteriocinas, mediante la fermentación del *L. lactis* UQ2, en el medio comercial MRS. Perfil de pH, 30 °C.

## 6.6 Espectro de Actividad anti-listeria del ELC.

Todas las cepas de *Listeria monocytogenes* utilizadas para este análisis, fueron sensibles al efecto antimicrobiano del ELC. En el Cuadro 11, se presentan los valores de la reducción de la población en base logarítmica para cada una de las cepas de *Listeria monocytogenes* al estar en contacto con dos diferentes concentraciones del ELC (5,200 UA/ml y 6,400 UA/ml), en caldo soya tripticaseína (CST). De acuerdo a estos valores se observa que la cepa de *L. monocytogenes* 10403S de origen animal fué la más sensible al efecto antimicrobiano del ELC presentando una reducción de 5 logaritmos de población a la más alta concentración del ELC comparado con el control, en el cual la misma cepa se desarrolló en las mismas condiciones sin la adición del antimicrobiano.

Mientras que la cepa de *L. monocytogenes* Scott A, aislada de un alimento, fué la más resistente a este compuesto, obteniendo una reducción de tan solo 1 logaritmo de población a la más alta concentración del ELC, en comparación con el control, desarrollado a las mismas condiciones sin la adición del antimicrobiano.

Se han realizado diversos estudios acerca de la sensibilidad de diferentes cepas de *L. monocytogenes* contra diferentes bacteriocinas, tales como las producidas por *L. lactis* (Cai y col., 1997; Benkerroum y col., 2000), así como las producidas por *Lecunostoc carnosum* (Budde, y col; 2003), bacteriocinas purificadas como la nisina (Benkerroum y Sandine 1988), sakacina K (Leroy y De Vuyst, 1999) y pediocina AcH (Bhunia, y col., 1988) ha sido demostrada extensivamente.

Se han realizado diversos estudios acerca de la variación de la sensibilidad de las cepas de *Listeria* al efecto antimicrobiano de las bacteriocinas, en los cuales se ha encontrado que *L. monocytogenes* Scott A ha sido la más resistente al efecto de nisina (Yang y Ray., 1994).

**Cuadro 11.** Sensibilidad de siete cepas de *L. monocytogenes* ante el ELC

<i>Listeria monocytogenes</i>	Log UFC/ ml de reducción de <i>L. monocytogenes</i>	
	51, 200 UA/ml *	6,400 UA/ml *
Scott A	1	0.179
19112	3	1
7644	2	1
15313	3	3
SLCC 5764	2	1
1370	3	1
10403S	5	2

\* UA/ ml del ELC deshidratado mediante la técnica de difusión en agar

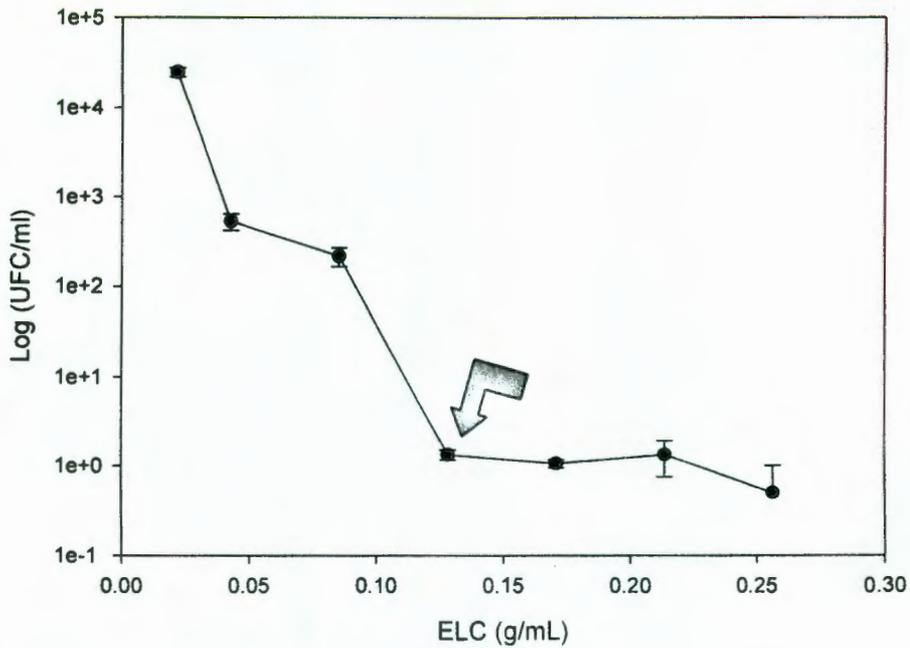
## **6.7 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de la cepas de *L. monocytogenes* más sensible y más resistente ante el efecto del ELC.**

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) para la cepa de *L. monocytogenes* Scott A, determinada como la más resistente, y para la más sensible *L. monocytogenes* 10403S ante el ELC, en el medio CST.

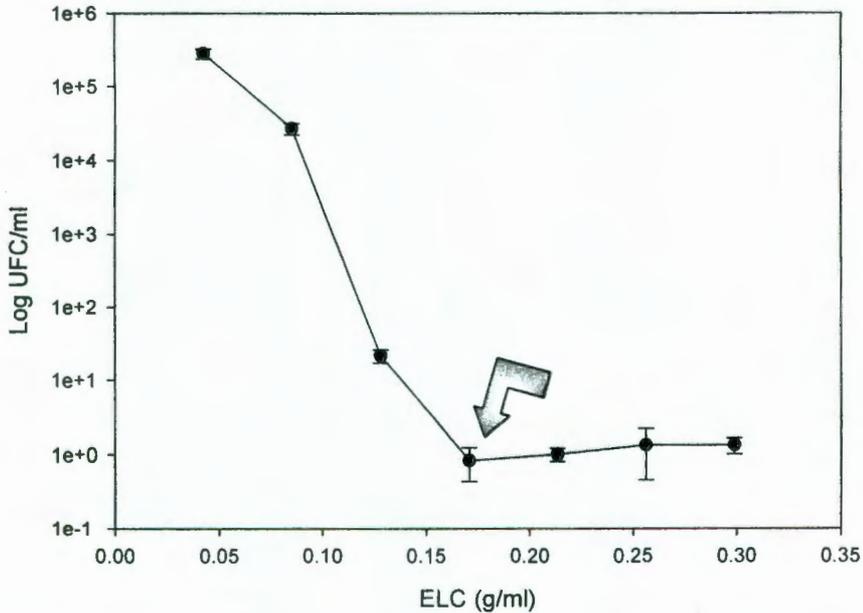
En la Figura 17, se observaron los valores de población de la cepa de *L. monocytogenes* 10403S contra la concentración del ELCs, en donde se obtiene el valor de la CMI, en un valor de 0.106 g/L.

En la Figura 18, se obtiene la misma gráfica para la *L. monocytogenes* Scott A, donde la CMI es de 0.1708 g/L

La concentración del ELC usada para la cepa de *L. monocytogenes* más sensible, fue 62% menor a la concentración utilizada para la cepa de *L. monocytogenes* más resistente.



**Figura 17.** Determinación de la CMI de la cepa de *L. monocytogenes* 10403S más sensible ante el efecto antimicrobiano del ELC. 0.106g/L.



**Figura 18.** Determinación de la CMI de la cepa de *L. monocytogenes* Scott A, la más resistente ante el efecto antimicrobiano del ELC. 0.1708 g/L.

## 6.8 Efecto del pH sobre la actividad antimicrobiana del ELC.

Se evaluó el efecto del pH, sobre la actividad anti-*Listeria* del ELC, en un rango de pH entre 5 y 9. La actividad del ELC permaneció estable en un amplio rango de valores de pH, en comparación con los controles, analizados en las mismas condiciones, sin la adición del antimicrobiano. La estabilidad de la actividad de las bacteriocinas a amplios valores de pH es relativamente común para la mayoría de las bacteriocinas (Ivanova y col., 2000). Un gran número de estudios han demostrado que *L. monocytogenes* es más ácido tolerante que la mayoría de los microorganismos patógenos relacionados con brotes alimentarios, aunque la sensibilidad de *Listeria* a ácidos orgánicos varía con la naturaleza del acidulante utilizado (Sorrels y col., 1989).

En las Figuras 19 y 20, se observa la sensibilidad tanto de *L. monocytogenes* 10403S y *L. monocytogenes* Scott A ante el efecto antimicrobiano del ELC, a valores de pH de 5, 7 y 9. La sensibilidad de ambas cepas muestran patrones similares.

La máxima actividad anti-*Listeria* del ELC, fue asociada a un rango de valores de pH entre 5 y 7. Cuando el ELC se añadió en el medio de cultivo a valores de pH de 5, 6 y 7, se observó con reducción de la población entre 4 y 5 Log, para el mayor efecto antimicrobiano; mientras que a valores de pH de 9, no se observó un efecto tan predominante. Estos datos muestran que las cepas de *Listeria* analizadas son más vulnerables a valores de pH ácidos, o bien que la actividad de la bacteriocina a pH alcalinos es baja.

A valores de pH de 6 y 7 se logró una reducción de cerca de 5 log, sin embargo a pH alcalinos se presenta una reducción en la eficiencia del antimicrobiano.

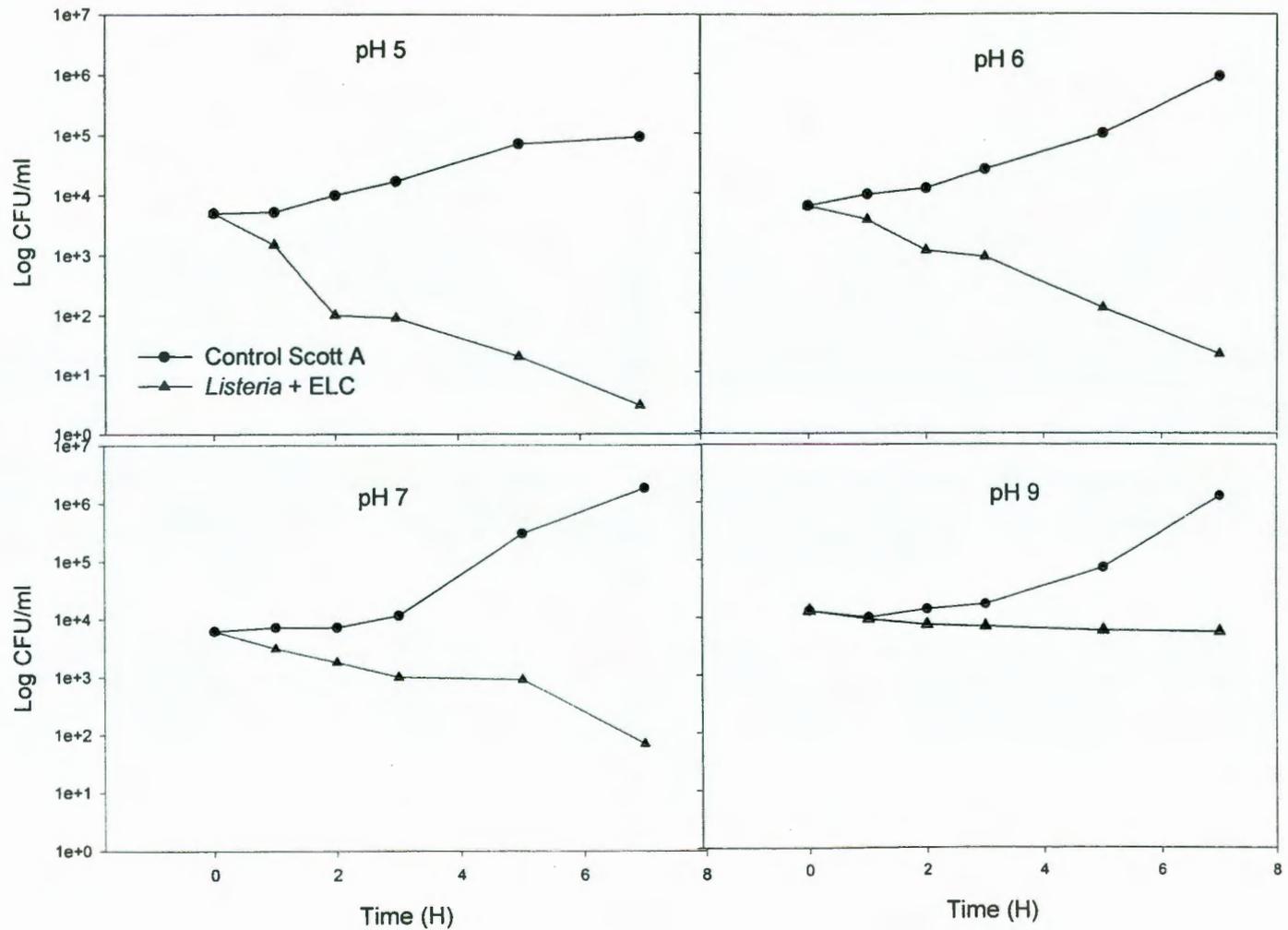


Figura 19. Efecto del pH en la actividad anti-listeria del ELC en *L. monocytogenes* Scott A

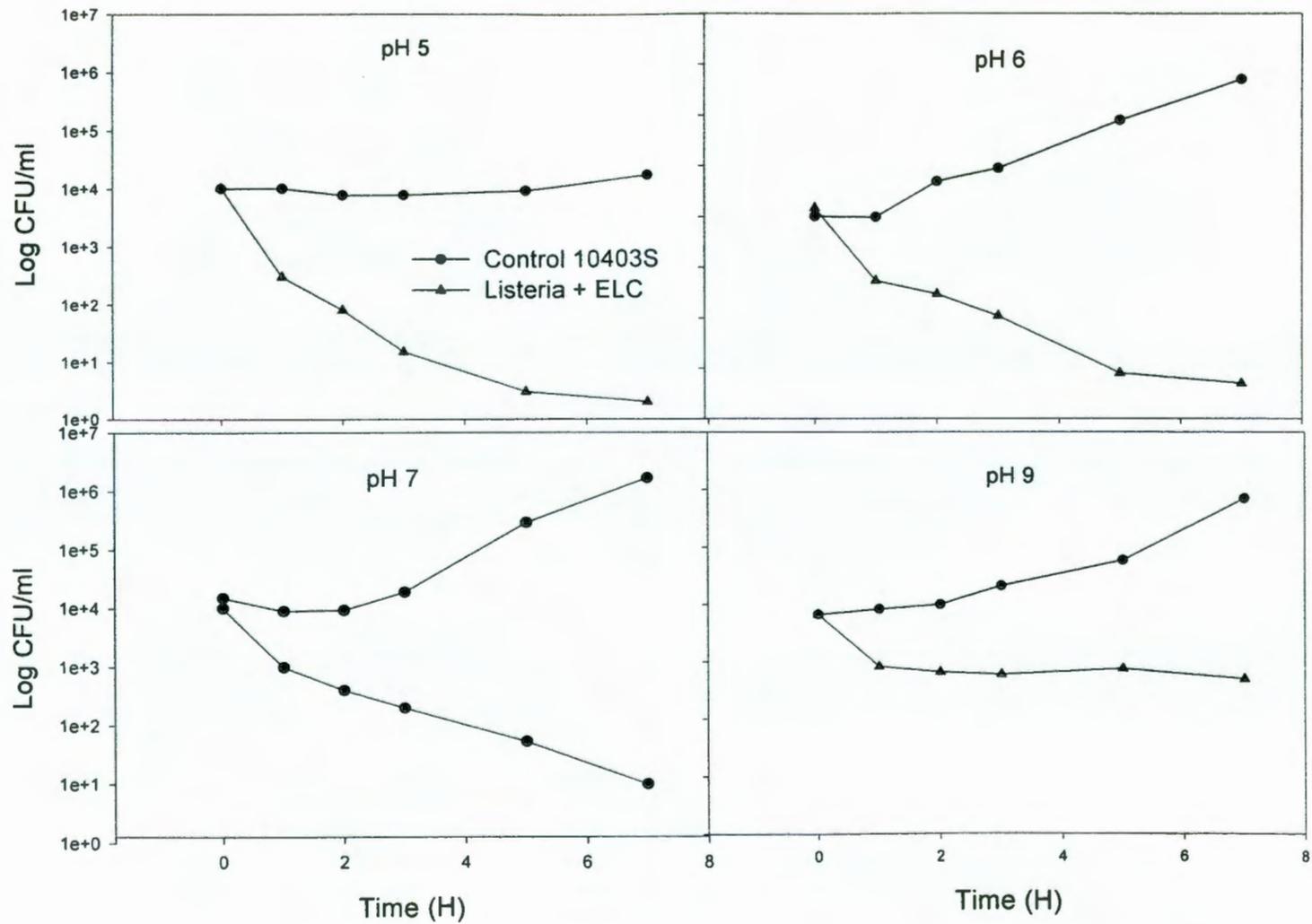


Figura 20. Efecto del pH en la actividad anti-listeria del ELC en *L. monocytogenes* 10403S

De acuerdo a Khalid y col., (1996), la motilidad de *L. monocytogenes* se ve afectada por el pH y la temperatura del medio, a un valor de pH 7 se encontró el máximo desarrollo de motilidad, mientras que a pH por debajo de 5 y por arriba de 10 las cepas de *L. monocytogenes* presentaron motilidad casi nula. A valores de 5.5, 6.0, 7.0 y 9.0 a una temperatura de 35° C se presentó los mayores valores de motilidad. La motilidad de *Listeria* es considerada como un factor de virulencia, el cual es afectado por el pH.

La actividad anti-listeria de las bacteriocinas producidas por *L. lactis* UQ2 fueron más efectivas a valores de pH bajos, como ha sido observado en otros estudios (Henning y col., 1986) o puede atribuirse a que existe un efecto aditivo del ácido y la actividad anti-listeria. La actividad del ELCs a valores de pH 9 fue menor que a valores de pH ácidos. La nisina, bacteriocina producida por *L. lactis*, es estable a bajos valores de pH, pero decrece drásticamente a pH por arriba de 7. (Delves-Broughton, 1990; Ray y Daeschel., 1992; Doyle y Roman., 1987; Mohamed y col., 1984). Sin embargo, permanece estable después de esterilizarse a 115.6° C a pH 2.0, pero pierde el 40% de su actividad a pH 5.0 y más del 90% a pH 6.8 (Hurst, 1981)

La estabilidad de la actividad de las bacteriocinas producidas por *L. lactis subs. lactis* no presentaron cambio en un pH de 3 a 10, sin embargo hubo pérdida de su actividad a valores de pH de 2, 10, 11 y 12. (Ivanova, 2000). De acuerdo a Todorov y col., (2004) en la cual se analizaron 4 diferentes bacteriocinas producidas por cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus* en la cual mostraron mantener su actividad a pH de 2 a 12 utilizando como microorganismo indicador *L. casei* LHS. García y col., (2004), demostraron que la enterocina producida por *Enterococcus faecalis* tuvo efecto antimicrobiano contra *Bacillus* a valores de pH 7, sin embargo a pH 9 y 4 la actividad se vio inhibida. Bacteriocinas obtenidas por fermentación de *Lactobacillus* presentaron actividad a un amplio rango de valores de pH (2 a 8) y el decrecimiento en la actividad a un pH de 8, 10 y 12 (Ogunbawo, 2003).

## 6.9 Efecto antimicrobiano del ELC en biopelículas formadas por *L. monocytogenes* Scott A en superficie de acero inoxidable.

Se han realizado estudios acerca de la habilidad de *L. monocytogenes* para formar biopelículas en superficies y equipo en industrias procesadoras de alimentos (Herald y Zottola, 1988; Blackman y Frank, 1996). Así también se han desarrollado métodos tanto físicos, como químicos para poder eliminar los microorganismos (biopelículas) de estas superficies, sin embargo, estudios en esta área han indicado que la adherencia de estos microorganismos a superficies de acero inoxidable, pueden ser mucho más resistente a compuestos sanitizantes que los microorganismos libres, presentes en medios líquidos (Frank y Koffi, 1990).

Se determinó en este estudio la viabilidad del ELC para remover las biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A en superficie de acero inoxidable. En el Cuadro 12, se muestran los valores de la reducción de la población de *L. monocytogenes* Scott A, a diferentes concentraciones del ELC. Se puede observar que a mayor concentración del ELC, mayor es el efecto en la inhibición del crecimiento. En las diferentes dosis utilizadas se observó una reducción de la población en la biopelícula de *Listeria* formada, de 2 a 4 Log UFC/ml.

En la Figura 21, se muestran imágenes obtenidas mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) de las biopelículas de *L. monocytogenes* Scott A, desarrolladas en medio CST, a 20° C. La figura 17A, muestra la densidad poblacional (6 Log) del control de *L. monocytogenes* Scott A, después de 5 días de tratamiento, para la formación de la biopelícula. En la figura 17B, se observa claramente la reducción en la densidad de la población ( $5.73 \times 10^3$  Log) de *Listeria* ante el tratamiento con el ELC.

Mediante este análisis se demostró que el ELC obtenido por la fermentación del *L. lactis* UQ2, en suero lácteo suplementado es un prometedor antimicrobiano para la remoción de las biopelículas formadas por *Listeria*.

**Cuadro 12.** Valores de la reducción de la población de *L. monocytogenes* Scott A. En superficies de acero inoxidable ante el efecto del ELC

ELC (g/ml)	Log UFC/ml de reducción de la población de <i>L. monocytogenes</i> Scott A
1.4208	4
0.9208	3
0.5874	2
0.3493	2
0.1708	1

Se aislaron diferentes cepas de bacterias lácticas de biopelículas formadas por *L. monocytogenes*, en equipo de plantas procesadoras de alimentos, así como en suelos de desagüe. Se observó que la cepa de *L. lactis* subs. *lactis* fue muy efectiva para controlar el desarrollo de las biopelículas de *L. monocytogenes* en largos periodos de tiempo, al ser inoculada en la biopelícula ya formada (Olasupo y col, 1999); también se determinó que la *Enterococcus durans* 152 también demostró ser efectiva en este análisis (Zhao, y col., 2004).

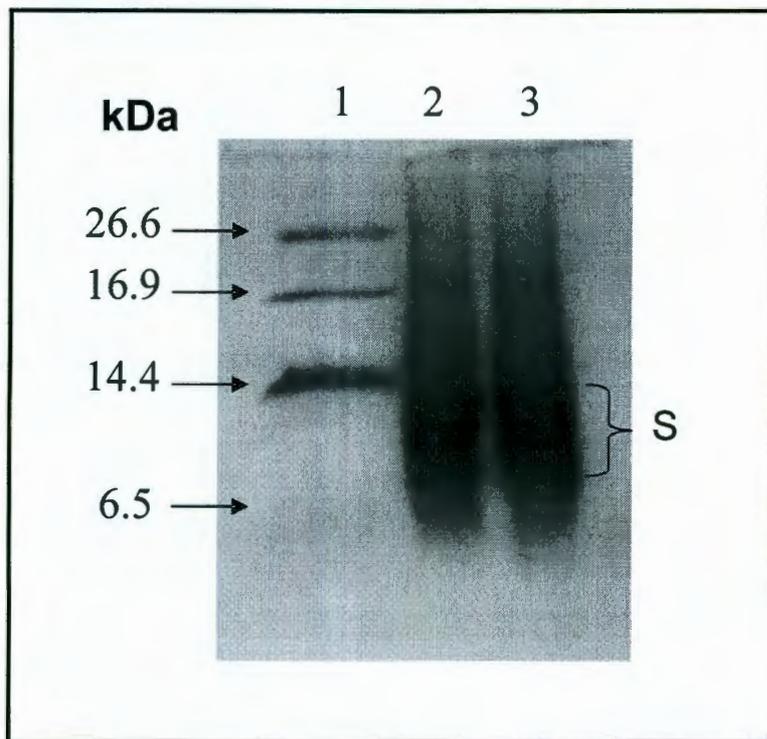
Barker y Park, (2001), encontró que la combinación de ácidos orgánicos, bajo pH y etanol proveen un efectivo tratamiento bactericida; la combinación más potente fue de pH 3.0, 50 mM de formato, y 5% (v/v) de etanol, resultando la reducción de 5 Log de *L. monocytogenes* en solo 4 min.

#### **6.10 Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

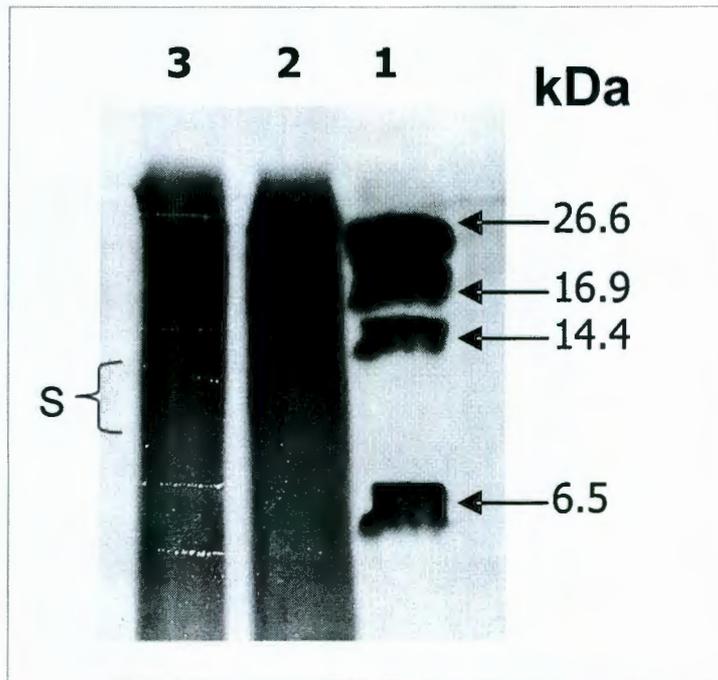
Para determinar el peso molecular del antimicrobiano, se utilizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida, utilizando el sistema tris-tricina (Schägger y Jagow, 1987). Se utilizó el EC liofilizado, además del ELC para la determinación del peso molecular del antimicrobiano.

En la Figura 22, se muestra el gel electroforético; en la muestra del EC liofilizado, en donde se observa que la banda (S) determinada, se encuentra entre 14.4 y 6.5 kDa, de acuerdo a los estándares utilizados.

En la Figura 23, Se utilizó el ELC, en el cual se observó el mismo patrón observado anteriormente. La banda se encuentra entre los valores de 14.4 y 6.5 kDa.



**Figura 22.** Electroforesis en gel de poliacrilamida. Tris-tricina. En el carril 1, se encuentran los estándares de peso molecular. El carril 2 y 3, se encuentran las muestras del EC. La zona más oscura (S), muestra las bandas que se encuentran entre 14.4 y 6.5 kDa. Esta banda presentó actividad antimicrobiana contra *M. luteus*



**Figura 23.** Electroforesis en gel de poliacrilamida ELC. Sistema Tris-tricina. Carril 1: Estándares de peso molecular. Carril 2 y 3, muestras de EC. La banda (S), presentó actividad contra *L. monocytogenes* Scott A.

## 6.11 Zimograma.

Para la determinación de la actividad antimicrobiana del EC liofilizado, se realizó la técnica de difusión en agar, utilizando como microorganismo indicador la cepa de *M. Luteus NCIB 8166*. En la Figura 24 se observa una zona de inhibición del crecimiento del *M. luteus*, ante la presencia de las bandas del EC obtenidas de la electroforesis.

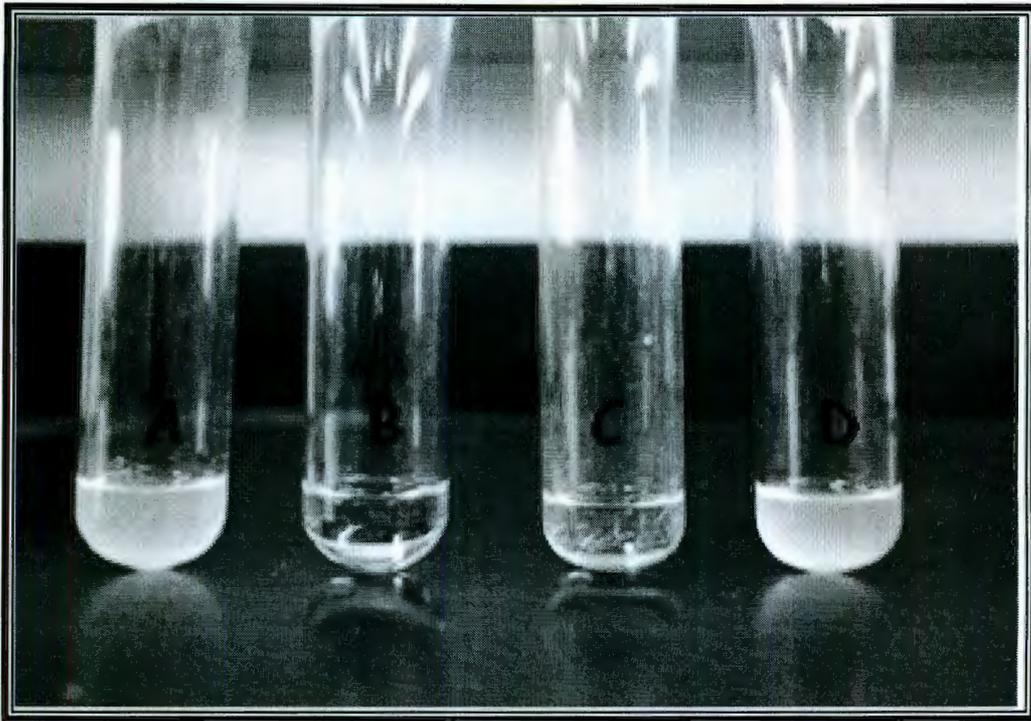
En cuanto al EC, se determinó su actividad anti-listeria. En la Figura 24, se observa que la banda (S), que presentó actividad anti-listeria, se encuentra entre los valores de 14.4 y 6.5 kDa, de acuerdo a los estándares. Se utilizó la técnica de la actividad en medio líquido, para determinar el efecto antimicrobiano de las bandas del EC en *L. monocytogenes* Scott A. Como control positivo, a 5 ml de CST (sin fragmentos del gel) se inocularon con  $1 \times 10^5$  UFC/ml de *L. monocytogenes* Scott A. Como control negativo se utilizó solamente el medio CST, sin la presencia de *Listeria*, ni el gel. Se utilizó otro control negativo, en donde se obtiene crecimiento de *Listeria*, ante la presencia de una banda del gel que no contenía agente antimicrobiano.

En la Figura 25, se demuestra plenamente la actividad anti-listeria, de la banda del gel de electroforesis, obtenida de la muestra de EC.

Estos resultados muestran, que el compuesto presente en el EC, que presenta actividad antimicrobiana contra *M. luteus* y actividad anti-listeria, presenta un peso molecular entre 14.4 y 6.5 kDa. Sugiriendo que se encuentra clasificado como una bacteriocina de tipo II, ya que ataca a *L. monocytogenes* y es termoresistente (Klaenhammer, 1993; Nes y col., 1996; Holo y col., 2000; Mc-Auliffe y col., 2001).



**Figura 24.** Zimograma del EC. Determinación de actividad por difusión en agar, usando como microorganismo indicador *M. luteus* NCIB 8166. En las placas se observa claramente la zona de inhibición del *Micrococcus*, ante la presencia de la banda del gel electroforético del EC.



**Figura 25.** Zimograma en medio líquido CST

**Control (A):** Medio CST inoculado con *L. monocytogenes* Scott A.

**Control (B):** Caldo CST sin *Listeria*.

**Control (D):** banda del gel electroforesis, presentando desarrollo completo de *Listeria*.

**Banda del gel con actividad anti-listeria (C):** contiene la banda del gel encontrada entre 14.4 y 6.5 kDa, inoculada con *Listeria*. Se observa inhibición del desarrollo de *Listeria*.

Estudios acerca de la determinación del peso molecular de la bacteriocina GM005 producida por *Lactococcus* spp. Encontraron una diferencia entre las técnicas utilizadas. Mediante la técnica de filtración en gel se determinó un peso molecular de 9.6 kDa, mientras con electroforesis tricina SDS-PAGE se encontró un peso molecular menor correspondiente a 2.4 kDa, teniendo esta banda actividad antimicrobiana. Estas observaciones sugieren que la bacteriocina nativa GM005 es un complejo tetramero, ya que en análisis subsecuentes mediante el análisis de la composición de aminoácidos se encontró que la secuencia N-terminal estaba bloqueada, indicando que podría ser una molécula cíclica (Onda y col., 2002).

Se determinó que la lactococcina producida por *L. lactis* KCA2386 presentó un peso molecular de aproximadamente 8.1 kDa mediante la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida tris.-tricina (Seuk-Hyun y Ahn, 2000).

## 7. CONCLUSIONES

La composición del medio de cultivo influyó en la producción de las bacteriocinas producidas por *L. lactis* UQ2 en el medio de cultivo a base de suero lácteo suplementado, a nivel de biorreactor.

Un diseño de  $2^{5-1}$  permitió la determinación satisfactoria de los factores más importantes que afectaron la producción de las bacteriocinas; encontrándose que la interacción flujo de aire-extracto de levadura, presentó un efecto significativo de acuerdo al diseño de escrutinio.

La actividad de bacteriocina en el medio de suero lácteo suplementado fue el doble de la actividad encontrada en el medio MRS a nivel de biorreactor, observándose que en el tiempo en el cual se obtuvo la máxima producción de bacteriocina fue menor, por lo cual se logró el objetivo de aumentar la producción de actividad de bacteriocina en el medio suero suplementado

La producción de bacteriocinas presentó un comportamiento de metabolito primario, como la mayoría de las bacteriocinas estudiadas.

Siete cepas de *L. monocytogenes* aisladas de diferentes fuentes, tuvieron una sensibilidad variable, al efecto antimicrobiano del extracto libre de células en polvo (ELCs), obtenido de la fermentación del *L. lactis* UQ2 en suero suplementado como medio de cultivo a nivel de biorreactor.

La cepa de *L. monocytogenes* 10403S fue la más sensible, mientras que la cepa de *L. monocytogenes* Scott A fue la más resistente al agente antimicrobiano producido.

El ELC, mantuvo su actividad antimicrobiana, en un amplio rango de valores de pH (5 a 9).

Se encontró que el ELC es un candidato promisorio para el control de las biopelículas formadas por *L. monocytogenes* en superficies de acero inoxidable.

El peso molecular de los péptidos del ELC, se encontró entre 6.5 y 14.4 kDa. y su actividad contra las diferentes cepas de *L. monocytogenes* sugiere que se encuentra por lo menos una bacteriocina que se puede clasificar como una bacteriocina del tipo II.

## 8. REFERENCIAS.

- ADPI. American Dairy Products Institute 2002. Whey Products Utilization & Producción Trends. ILL. 35.
- Alais, C. 1988. Ciencia de la Leche. Principios de técnica lechera. Edit. CECSA. México. 126-132.
- Alzamora, S. M., Tapia, S. M. and López-Malo, A. 2000. Minimal processed fruits and vegetables. Fundamental aspects and applications. Aspen publ. USA. 215-238.
- Amstrong D. 1995. *Listeria monocytogenes*. In Mandell G. L., Douglas, R. G., Bennet. Jr. Enfermedades infecciosas, Principios y Prácticas. New York..
- Archibald, F. 1986. Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria. Crit Rev. Microbiol. **13**, 63-109.
- Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: clasification and physiology. En: Lactic acid bacteria. Salmunen, S and von Wrigth A. Marcel Dekker, Inc. New york. 153.
- Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1983. Activity of Lactacin B a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environm. Microbiol. **45**:1808-1815.
- Barker, C. and Park S. F. 2001. Sensitization of *Listeria monocytogenes* to low pH, organic acids, and osmotic stress by ethanol. Appl. Environm. Microbiol. **67**: 1594-1600.
- Barrena-González, C., Huot, E. and Petitdemange, H. 1996. Mode of action of a bacteriocin (J46) produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J46. J Food Prot. **59**, 955-962.
- Benkerroum N., Oubel H., Zahar M., Dlia S. and Filali-Maltouf A. 2000. Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subs. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. J. Appl. Microbiol. **89**: 960:968.
- Benkerroum, N. and W. E. Sandine, W. E. 1988. Inhibitory action of nisin against *Listeria monocytogenes*. J. Dairy Sci. **71**:3237-3245.
- Benkerroum, N., Ghouati, Y., Sandine, W. E. and Tantaoui-Elaraki, A. 1993. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. Lett. Appl. Microbiol. **17**:78-81.
- Beuchat, L. R. and Golden, D. A. 1989. Antimicrobials occurring naturally. Food Technol. **43**:137-142.
- Bhunja A. K., Johnson M. C. and Ray B. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. **65**: 261-268.
- Bibek, R. and Bozoglu, T. F. 1992. Lactic acid bacteria: Current advances in metabolism, genetics and applications. Springer, Berlin. **98**: 253-267.
- Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. and Ray B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 1265-1267.
- Blackman, I. C., and J. F. Frank. 1996. Growth of *Listeria monocytogenes* as a biofilm on various food-processing surfaces. J. Food Prot. **59**:827-83.
- Blake R., Norton W. and Howard G. 1998. Adhesion and growth of a *Bacillus* spp on a polyesterurethane. Int Biodeterior Biodegradation **42**:63-73.
- Bonev, B. B., Breukink, E., Swiezewska, E., De Kruijff, B. and Watts, A. 2004. Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin. FASEB J. **15**:1862-1869.

- Borucki, K. M., Peppin, D. J., White, D., Loge, F. and Call, R. D. 2003. Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*. Appl. Environm. Microbiol. **69**:7336-7342.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Reproduction Research Laboratories, Dept. of Biochemistry, University of Georgia, Athens, Ga. 29.
- Britton, L., Malinowski, D. D. and Fridovich, I. 1978. Superoxido dismutasa and oxygen metabolism in *Streptococcus faecalis* and comparisons with other organisms. J. Bacteriol. **134**:229-236.
- Bruhn, J. C. and Collins, E. B. 1970. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase of streptococcus diacetilactis. J. dairy Sci. **53**:857-860
- Buchman G. W., Banerjee S. and Hansen J. N. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. J. Biol. Chem. **263**:16260-16266.
- Budde, B.B., Hornbæk, T., Jacobsen, T. Barkholt, V. and Koch, A.G. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. Inter. J. Food Microbiol. **83**: 171-184.
- Bylund, G. M. 2002. Manual de industrias lácteas. Edit. Mundi-Prensa. Madrid. España. 123-128.
- Cabo, M. L., Murado, M. A., González, M. P. and Pastoriza, L. 1999. A method for bacteriocin quantification. J. Appl. Microbiol. **87**:907-914.
- Cai, Y., Ng, L.-K., Farber, J.M. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from beans-sprouts. J. Appl. Microbiol. **83**: 499-507.
- Callewaert, R. and De Vuyst, L. 2000. Bacteriocin Production with *Lactobacillus amylovorus* DCE471 is Improved and stabilized by Fed-Batch Fermentation. Appl. and Environ. Microbial. **66**:606-613.
- Castaño, T. E. y Domínguez, D. J. 2003. Experimentos: Estrategia y Análisis en Ciencia y Tecnología. S y G Edit., S.A de C.V. México.
- Chavant, P., Gaillard-Martinie, B. and Hébraud, M. 2004. Antimicrobial effects of sanitizers against planktonic and sessile *Listeria monocytogenes* cells according to the growth phase. Microbiol. Letters. **236**:241-248.
- Cherubin, C. E., Appleman, M. D. And Heseltine, P. N. R. 1991. Epidemiological spectrum and current treatment of listeriosis. Rev. Infect. Dis. **13**:1108-1114.
- Condon, S. 1987. Responses of lactic acid bacteria to oxygen. FEMS Microbiol. Rev. **46**:269-280
- Dahl, T. A., Midden, W. R. and Hartman, P. E. 1989. Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. J. Bacteriol. **171**:2188-2194.
- Davey, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. Appl. Environm. Microbiol. **48**:895-896.
- Davidson, P. M. and Branen, A. L. 1993. Antimicrobials in foods. Second edition. Marcel dekker. New York. 369-393.
- De Man, J. C., M. Rogosa, and M. E. Sharpe. 1960. A medium for the cultivation of *lactobacilli*. J. Appl. Ind. Bacteriol. **23**:130-135.
- De Vos W. M. and Vaughan E. E. 1994. Genetics of lactose utilization in lactic acid

bacteria. <i>Microbiol Rev.</i> <b>15</b> :217-237
De Vuyst, L. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by <i>Lactococcus lactis</i> subs. <i>lactis</i> NIZO 22186 in a synthetic medium. <i>J. Appl. Bacteriol.</i> <b>78</b> :28-33.
De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> batch fermentations. <i>J. gen. Microbiol.</i> <b>138</b> : 571-578.
De Vuyst, L., Callewaert, and Crabbé K. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by <i>Lactobacillus amylovorus</i> and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions. <i>Microbiology</i> <b>142</b> :817-827.
Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. <i>Food Technol.</i> <b>44</b> :100-112.
Doyle, M. P. and Roman, D. J. 1987. Growth and survival of <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>jejuni</i> as a function of temperature and pH. <i>J. Food Protect.</i> <b>44</b> :596-601.
Dubois, M., Gibs, K. A., Hamilton, J. K., Roberts, D. A. and Smith, F. 1956 Colorimetric Methods for Determination of Sugars and Related Substances. <i>Anal. Chem.</i> <b>28</b> :350-352.
Egorov, N. S., Baranova, I. P., Kozlova, Y. I., Volkov, A. G., Grushina, V. A., Isai, E. I. and Sidorenko, A. T. 1980. A new nutrient medium for <i>Streptococcus lactis</i> producing nisin. <i>Antibiotiki.</i> <b>25</b> :260-263.
Eijsink V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Brurberg, M. B. and Nes I. F. 1998. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> <b>64</b> :3275-3281.
Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity <i>FEMS. Microbiol. Rev.</i> <b>24</b> :85-106.
Eppich H. 2000. Pulsed electric fields rapidly size-select hematopoietic cells and deplete tumor cell contaminants. <i>Nature Biotechnol.</i> <b>18</b> :882-887.
FDA, 1988. Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. <i>Fed Reg.</i> <b>53</b> :11247-11258.
Frank, J. F., and Koffi, R. A. 1990. Surface-adherent growth of <i>Listeria monocytogenes</i> is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. <i>J. Food Prot.</i> <b>53</b> :550-554.
García, M. T; Lucas, R; Abriouel, H; Omar N. B; Perez, R; Grande, M. J; Martínez-Cañamero M. and Gálvez, A. 2004. <i>J. Appl. Microbiol.</i> Antimicrobial activity of enterocin EJ97 against <i>Bacillus macroides/Bacillus maroccanus</i> isolated from zucchini pure. <b>1</b> :1-7.
García-Almendárez, B., Ibarra-Silva, J., Mayorga-Martínez, J., Domínguez-Domínguez, J., Regalado, C. 2002. <i>Engineer. and Food for the 21 century.</i>
Gasson M. J. and de Vos W. M. 1994. Genetics and biotechnology of lactic acid bacteria. Chapman y Hall press. 229-240.
Genigeorgis, C. A., Oanca, P. and Dutulescu, D., 1990. Prevalence of <i>Listeria spp</i> in turkey meat at the supermarket and slaughter-house level. <i>J. Food Protect.</i> <b>53</b> : 282-288.
Gibas y col., 2004
Gómez, M. M. 2002. Producción de bacteriocinas en suero lácteo. Residencia. UAQ
Guerra, N. P, Rúa M. L. and Pastrana, L. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria on whey. <i>Int. J. Food Microbiol.</i>

70:267-81.

Guerra, N. P., Pastrana, L. 2002a. Production of bacteriocins from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 and *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 using mussel-processing wastes. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **36**:119-125

Guerra, N. P., Pastrana, L. 2002b. Dynamics of biosynthesis in batch fermentation on whey. *Elec. J. Environ. Agric. Food Chem.* **1**:2.

Hansen, J. N. 1993. The molecular biology of nisin and its structural analogs. En Hoover, D. and Steenson, L. *Bacteriocins of lactic acid bacteria*. New York. Academic Press. 93-120.

Hansson, L. and Haggström, M. H. 1984. Effects of growth conditions on the activities of superoxide dismutase and NADH-oxidase/NADH-peroxidase in *Streptococcus lactis*. *Curr. Microbiol.* **10**:345-352.

Hasper, H. E., de Kruijff, B. and Breukink, E. 2004. Assembly and stability of nisin-lipid II pores. *Biochemistry*.**36**:11567-11575.

Henning, S., Metz, R. and Hammes, W. P. 1986. New aspects for the application of nisin to food products based on its mode of action. *Int. J. Food Microbiol.* **3**:135-141.

Herald, P.J. and Zottola, E. A. 1988. Effect of various agents upon the attachment of *Pseudomonas fragi* to stainless steel. *J. Food Sci.* **54**:461-464.

Hickmann, F. S. and Monte A. R. 2001. Nisin production from *Lactococcus lactis* A.T.C.C. 7962 using supplemented whey permeate. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **34**:103-107

Himelbloom, B., Nilsson, L. and Gram, L. 2001. Factors affecting production of an antilisterial bacteriocin by *Carnobacterium piscicola* strain A9b in laboratory media and model fish systems. *J. Appl. Microbiol.* **91**:506-513.

Holo, H., Nilssen, O. and Nes, I. F. 1991. Lactococcina A, a new bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*: isolation and characterization of the protein and its gene. *J. Bacteriol.* **173**:3879-3887.

Hugenholtz, J., Perdon, L. and Abee T. 1993. Growth and energy generation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* during citrate metabolism. *Appl. Environm. Microbiol.* **59**:4216-4242.

Hurst, A. 1981. Nisin. *Adv. Appl. Microbiol.* **27**:85-123.

ICMSF, 1978. Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), 2nd Ed. Univer. Toronto Press, Toronto. 431.

INTA, 2001. Revista de nutrición y tecnología de los alimentos. XXI N° 5. Edit. Socias Ltda. Santiago de Chile. 56-62

Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subs. *lactis* B14 isolated from Boza-bulgarian traditional cereal beverage. *Biocatalisis*.**12**:1252-1258.

Jensen, N. B. S., Melchiorsen, C. R., Jokumsen, V. K. and Villadsen, J. 2001. Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* MG1363 in Microaerobic Continuous cultivation dilute rate. *Appl. Environm. Microbiol.* **67**:2677-2682.

Joerger M. C. and Klaenhammer T.R. 1986. Characterization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by *Lactobacillus helveticus* 48J. *J. of Bacteriol. Appl.* **167**: 439-446.

- Kerry, K. G., Bierkenhead, d., Seale, K., Major, J. and Hawwkey, P. M. 1993. Prevalence of *Listeria* spp. On the hands of food workers. *J. Food Protect.* **56**:525-527.
- Khalid, S, N., Afza, H. A., Rizvi, and Badar, Y. 1996. Antibacterial and phytochemical studies on *Dicoma tomentosa*. *Pakistan J. of Scientific and Industrial Research* **38**:464.
- Kim, W.S 1997. Nisin production by *Lactococcus lactis* using two-phase batch culture *Letters in Applied Microbiology.* **25**, 169-171.
- Klaenhamer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* **70**:337-349
- Klaenhamer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* **12**, 39-86
- Klandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **49**:209-224.
- Kok, J., Holo H., van Belkum M., Haandrikman A. J. and Nes, I. F. 1993. No nisin bacteriocins in *lactococci*: biochemistry, genetic and more of action. Academic Press, New York, 121-150.
- Konings, W. N. and Otto, R. 1983. Energy transduction and solute transport in *Streptococci*. *Antoine Leeuwehoek* **49**:247-257
- Kozak, W., Bardowski, J. and Dobrzanski, W. T. 1978. Lactostrepcins-acid bacterioicns produced by lactic *streptococci*, *J. Dairy Res.* **45**:142:146.
- Krier, F., Revol-Junelles, A. M. and Germain, P. 1998. Influence of temperature and pH on production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides* FR52 during batch fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**:359-363.
- Le Marrec C., Hyronimus B., Bressollier P., Verneuil B. and Urdaci M. C. 2000. Biochemical and genetic characterization of coagulin, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins, produced by *Bacillus coagulans* I (4). *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:5213-20.
- Lejeune R., Callewaert R., Crabbé K. and De Vuyst L. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. *Journal of Applied Microbiology.* **84**: 159-168.
- Leroy F. and de Vuyst, L. 1999. The precence of salt and curing agent reduces bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CTC 494, a potential starter culture for sausage fermentation. *Appl. Environm. Microbiol.* **65**:5350-5356.
- Lewus, C. B. and Montville, T. J. 1991. Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *J. Microbial Meth.* **13**: 145-150.
- Lewus, C. B. and Montville, T. J. 1992. Further characterization of bacteriocins plantaricin BN, Bavaricin MN and Pediocin A. *Food Biotech.* **6**:153-174.
- Li, Ch., Bai, B., Cai, Z., Ouyang, F. 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. *J. Biotecnol.* **93**, 27-34.
- Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* **87**:149-164.
- Linton A. H. 1977. Antibiotic resistance: the present situation reviewed. *Vet Rec* **100**:354-360.
- Liu, C., Liu, Y., Wen, Z and Chen, S. 2003. Application of statistically-based experimental design for the optimization of nisin production from whey. *Biochem. Letters* **25**:877-882.
- Liu, W. and Hansen, N. J. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a

small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**:2552-2558.

Lloyd, A. G. and Drake, J. J. O. 1975. Problems posed by essential food preservatives *Br. Med. Bull.* **31**:214-219.

Loncarevic, S., M.-L. Danielsson-Tham, and W. Tham. 1995. Occurrence of *Listeria monocytogenes* in soft and semi-soft cheeses in retail outlets in Sweden. *Int. J. Food Microbiol.* **26**:245-50.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 2000. *Brock Biología de los microorganismos*. Edit. Prentice Hall. España. 225-340.

McAuliffe O., Ross R. P., and Hill C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**:285-308.

McBain, A. J., Bartolo, R. G, Catrenich, C. E, Charbonneau, D., Ledder, R. G., Richard, A. H, Wymmons, S. A. and Gilbert, P. 2003. Microbial characterization of biofilms in domestic drains and the establishment of stable biofilm microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:177-185.

Miles, A. A., Misra, S. S., Irwin, J.O. 1938. The estimation of bactericidal power of blood. *J. Hyg.* **38**:733-749.

Mohamed, G. E., Seaman, A. and Woodbine, M. 1984. Food antibiotic nisin comparative effect on *Erysipelothrix* and *Listeria*. In: Woodbine M. (Ed), *Antimicrobials and Agriculture*. Butterworth, London. 435-442.

Moltz A. G. y Martin S. E. 2005. Formation of Biofilms by *Listeria monocytogenes* under various growth conditions. *J. Food Protection.* **68**:92-97.

Monod J. 1949. The growth of bacterial cultures. *Annual review of Microbiology.* **3**: 371-394.

Montgomery, C. D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo edit. Iberoamerica. México. 467-521.

Møortvedt-Abildgaard, C. I., J. Nissen-Meyer, B. Jelle, B. Grenov, M. Skaugen, and I. F. Nes. 1995. Production and pH-dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:175-179.

Morr, C. V. and Ha E. Y. 1993. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties. *Crit Rev Food Sci. Nutr.* **33**:431-76.

Muriana, P. M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. *J. Food Protection, suppl.* **12**:54-63.

Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:114-121.

Nel H.A. Bauer, R., Vandamme, E. J. and Dicks, L. M. 2001. Growth optimization of *Pediococcus dammosus* NCFB 1832 and the influence of pH and nutrients on the production of pediocin PD-1. *J. Appl. Microbiol.* **91**:1131-1138.

Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg M. B., Eijsink V. G. H., and Holo H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**:113-128

Nielsen, T., Nes, I. F. and Holo, H. 1998. An exported inducer peptide regulates bacteriocin production in *Enterococcus faecium* CTC 492. *J. Bacteriol.* **180**:1848-1854.

Nissen-Meyer, J., Holo, H. Havastein L. S. Sletten, K. and Nes I. F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two

peptides. <i>J. Bacteriol.</i> <b>174</b> :5686-5692.
NOM-121-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana. Bienes y Servicios. Quesos: Frescos, Madurados y Procesados. Especificaciones Sanitarias.
Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude A. A. 2003. Influence of cultural conditions on production of bacteriocin by <i>Lactobacillus brevis</i> OG1. <i>African J. Biotechnol.</i> <b>7</b> :179-184.
Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzapfel, W. H. 1999. Occurrence of nisin Z production in <i>Lactococcus lactis</i> BFE 1500 isolated from <i>wara</i> , a traditional Nigerian cheese product. <i>J. of Food Microbiol.</i> <b>53</b> :141-152.
Onda, T; Yanagida, F; Tsuji, M; Shinohara, and Yokotsura, T. K. 2002. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by <i>Lactococcus sp.</i> Strain GM005, isolated from Miso-Paste. <i>Inter. J. Food Microbiol.</i> <b>87</b> :153-159.
Parente, E. and Ricciardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. <i>Lett. Appl. Microbiol.</i> <b>19</b> :12-15.
Parente, E., and Hill, C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. <i>J. Appl. Bacteriol.</i> <b>73</b> : 290-298.
Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A. and Addario, G. 1997. Growth and bacteriocin production by enterococcus faecium DPC1146 in batch and continuous cultura. <i>J. Ind. Microbiol. Biotechnol.</i> <b>18</b> :62-67.
Piard, J. C. and Desmazeaud, M. J. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 2-Bacteriocins and other antimicrobial substance. <i>Lait</i> , <b>72</b> :113-142.
Piard, J. C., Delome, F. Giraffe, G., Comissaire, J. and Desmazeaud, M. 1990. Evidence of bacteriocin produced by <i>Lactococcus lactis</i> CNRZ 481. <i>Neth. Milk Dairy J.</i> <b>44</b> :143-158.
Piva, A and Headon. D. R. 1994. Pediocin A, a bacteriocin produced by <i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB61. <i>Microbiol.</i> <b>40</b> :697-702.
Ray B. and Daeschel, M. 1992. Foods and microorganisms of concern; in food biopreservatives of microbial origin. CRC Press. México.11-21
Requena, T. y Peláez, C. 1995. Actividad Antimicrobiana de bacterias lácticas. Producción de bacteriocinas. <i>Rev. Esp. Cienc. Tecnol. Alimen.</i> <b>35</b> :19-44.
Rhodes, P. M. and Stanbury, P. F. 1997. Applied Microbial Physiology. A practical approach. IRL press. New York.
Robbins, J. R., Barth, A. I., Marquis, H., de Hostos, E. L., Nelson, W. J. and Theriot, J. A. 2000. <i>Listeria monocytogenes</i> exploits normal host cell processes to spread from cell to cell. <i>J. Cell Biol.</i> <b>146</b> :1333-1350.
Ryser, E. T., and E. H. Marth, ed. 1999. <i>Listeria</i> , Listeriosis and Food Safety. 2nd ed. Marcel Dekker, New York. 23.
SAGAR, 2000. Centro de Estadística Agropecuaria. Boletín Bimestral de la Leche de Bovino, noviembre-diciembre de 2000.2-21.
Sahl H. G. and Bierbaum G. 1998. Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram positive bacteria. <i>Ann. Rev. Microbiol.</i> <b>52</b> :41-79.
Salminen, S. and von Wright A. 1993. Lactic acid bacteria. Marcel Dekker press. USA. 97-104. 50.
Sánchez, O. I. 2003. Uso del permeado de suero suplementado en la producción de bacteriocinas y su aplicación en la bioconservación. Tesis. UAQ.

- Sandoval, B. G., Peña, G. G., García-Almendárez, B. y Regalado G. C. 2003. Producción de bacteriocinas de *Lactococcus lactis* usando suero dulce suplementado. Estancia de Investigación. UAQ. Depto biotecnología.
- Schägger, H. and Jagow, G. 1987. Tricine-sodium dodecylsulfate polyacrylamide del electrophoresis for the separation of protein in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* **166**:368-379.
- Schillinger, U. Geisen, R. and Holzapel, W. H. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. *Trends Food Sci. Tech.* **7**:158-164.
- Schnell N, Entian K. D., Schneider U., Götz F., Zahner H., Kellner R and Jung G. 1998. Preptide sequence of epidermin, a ribosomally synthesized antibiotic with for sulphide rings. *Nature* **333**:276-278.
- Schwartz B., Hexter, D. and Broome, C. V. 1989. Investigation of an outbreak of listeriosis: New hypotheses for etiology of epidemic *Listeria monocytogenes* infections. *J. Infect Dis.* 159-680.
- Seelinger, H. P. R., Jones, D. 1986. Genus *Listeria* Pie 1940. In sneath Ph, Mair NS, sharpe M. E. Et al: *Bergey's manual of systematic Bacteriology.* **2**:1235-1245.
- Seuk-Hyun K. and Ahn, Ch. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. *Food Sci. Biotechnol.* **9**:263-269.
- Shah N. and Jelen P. 1991. Lactose absorption by postweaning rats from yogurt, quarg, and quarg whey. *J. Dairy Sci.* **74**:1512-20.
- Shtenberg, A. J. and Ignatev, A. D. 1970. Nisin Fd. *Cosmet. Toxicol.* **8**:369
- Sorrells, K. M., Enigl, D. C. and Hatfield, J. R. 1989. Effect of pH, acidulant, time and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food. Prot.* **52**:571-573.
- Stiles M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhock.* **70**:331-345.
- Stiles, M. E. 1997. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* **70**:331-345.
- Swaminathan B, Rocout, J. and Bille, J. 1995. *Listeria*. In Murray, P. R., Baron, E. J. and Pfaller, M. A. *Manual of clinical microbiology.* Washington D. C, ASM Press. 341-348
- Tompkin, R. B. 2002. Control of *Listeria monocytogenes* in the food-processing environment. *J. Food Prot.* **65**:709-725.
- Todorov S, D., van Reenen C. A. and Dicks L. M. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. *Gen Appl Microbiol.* **50**:149-57.
- Tramer, J. and Fowler, G. G. 1964. Estimation of nisin in foods. *J. Sci. food Agric.* **15**:522-528.
- Van Ehusden, H. E., de Kruijff, B., Breukink, E. 2002. Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin. *Biochemistry.* **41**:12171-8.
- Van-Belkum, M. J., Kok, J. and Venema, G. 1992. Cloning, sequencing, and expression in *Escherichia coli* of lcnB, a third bacteriocin determinant from the *Lactococcal* bacteriocin plasmid p9B4-6. *Appl. Environm. Microbiol.* **58**:572-577
- Vazquez-Boland, J. A., Kuhn, M and Berche, P. 2001. *Listeria*. Pathogenesis and

molecular virulence determinants. <i>CMR</i> . <b>14</b> :584-640.
Vignolo, G. M., Kairuz, M. N., Ruíz, A. And Oliver G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by <i>Lactobacillus casei</i> CRL 705. <i>J. Appl. Bacteriol.</i> <b>78</b> :5-10.
Wan, J., Harkmark, K., Daviason, and B. E. 1997. Inhibition of <i>Listeria monocytogenes</i> by piscicolin 126 in milk and camembert cheese manufactures with a thermophilic starter. <i>J. Appl. Microbiol.</i> <b>82</b> :273-280.
Weinberg, E. D. 1989. In regulation of secondary metabolism in Actinomycetes. Edit. Shapiro. Boca Raton.
Wiedemann, I, Benz, R. and Sahl, H. G. 2004. Lipid II-Mediated Pore Formation by the Peptide Antibiotic Nisin: a Black Lipid Membrane Study. <i>J. Bacteriol</i> <b>186</b> :3259-3261.
Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff, B. and Sahl, H.G. 2001. Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity. <i>J. Biol. Chem.</i> <b>276</b> :1772-1779.
Wood, B. J. B. and Holzapfel W. H. 1995. The genera of lactic acid bacteria from the lactic acid bacteria Vol. 2. Edmundsbury Press. Great Britain. 174-234.
Wood, B. J. B. 1999. The lactic acid bacteria in healt & disease. Volumen I. Edit an aspen publication.
Yang, R. and Ray. B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by Lactic acid bacteria. <i>Food Microbiol.</i> <b>11</b> : 281-291.
Yang, R., Johnson, M. C., Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. <i>Appl. Environm. Microbiol.</i> <b>58</b> :3355-3359.
Yildirim, Z. and M.G. Jonhson. 1999. Detection and Characterization of a bacteriocin produced by <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> isolated from radish. <i>Letters Appl. Microbiol.</i> <b>26</b> :297-304.
Zhao, T., Doyle, M. P. and Zhao, P. 2004. Control of <i>Listeria monocytogenes</i> in a Biofilm by Competitive-Exclusion Microorganisms. <i>Appl. Environ. Microbiol.</i> <b>70</b> :3996-4003.
Zottola, E. A. and Sasahara, K. C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry- should they be a concern?. <i>Inter. J. Food. Microbiol.</i> <b>23</b> :125-148.

## 9. ANEXO

### 1. Análisis Estadístico.

Para obtener una variable respuesta que represente eficazmente el un proceso biológico, como es el caso de la producción de bacteriocinas, mediante la fermentación de *L. lactis* UQ2, es necesario considerar ciertos aspectos del proceso para obtener un valor de la variable respuesta que permita una homogeneidad en los datos de cada corrida y de esta manera obtener la una mejor precisión en el análisis estadístico.

Se consideraron diferentes modificaciones a la variable respuesta.

#### VM1. $(Df/Di) * Act$

En este análisis se consideran también los diámetros de las zonas de inhibición inicial y final, las cuales la división entre ellas, multiplicada por el valor de la mayor actividad obtenida representa una variable respuesta modificada, en la cual no se puede observar eficientemente grandes cambios entre corridas de fermentación. Debido a que la diferencia entre la división de diámetros entre una corrida y otra es muy pequeña. Así también al realizarse el análisis de con estos datos no se observo ningún efecto significativo de los 5 factores analizados, como se observa en el cuadro 13.

#### VM2. $(Df-Di) * Act$

---

T

En la modificación realizada en este análisis, se tomó en cuenta la substracción de los diámetros inicial y final, de manera que se obtuvieran valores más sensibles de zonas de inhibición entre cada corrida de fermentación, las cuales fueron multiplicadas por la máxima actividad encontrada. También se considero el tiempo de fermentación en el cual

se plantea que a menor tiempo de producción de bacteriocinas, menores costos de producción, de esta manera la división entre el valor obtenido anteriormente considera que a menor tiempo menores costos de producción y mayor rendimiento de la bacteriocina. Sin embargo al obtener el análisis de varianza no se logró observar ningún efecto principal significativo, solamente la interacción extracto de levadura- flujo de aire parece tener un ligero efecto en la actividad de bacteriocina.

## **2. Efecto de inhibición de *Listeria* ante el MIC del ELC.**

Una vez determinada la MIC para las cepas de *Listeria* más sensible y más resistente al efecto antimicrobiano del ELC, se realizó una cinética de crecimiento de cada una de las cepas de *Listeria*, añadiendo la MIC del ELC para poder observar el tiempo en que actúa el ELC. También se utilizó un ELC obtenido mediante las mismas condiciones que el ELC en suero lácteo suplementado, pero en medio MRS.

**Cuadro 13.** Orden y valores de la actividad modificada AM1 y AM2.

Orden	X4	X3	X2	X1	X5	AM1	AM2
1	-1	-1	-1	-1	1	1134.2	489.6
2	1	-1	-1	-1	-1	2457.4	778.6
3	-1	1	-1	-1	-1	1418.7	602.6
4	1	1	-1	-1	1	1962.6	1080
5	-1	-1	1	-1	-1	3929.8	2022.4
6	1	-1	1	-1	1	2221.5	1011.2
7	-1	1	1	-1	1	1947.8	768
8	1	1	1	-1	-1	4548.2	1625.6
9	-1	-1	-1	1	-1	1005.2	524
10	1	-1	-1	1	1	1270.8	168
11	-1	1	-1	1	1	2575.9	1536
12	1	1	-1	1	-1	4352	2640
13	-1	-1	1	1	1	3218.5	917.3
14	1	-1	1	1	-1	22224.9	972.8
15	-1	1	1	1	-1	5270.6	2986.6
16	1	1	1	1	1	4535.4	2099.2
17	0	0	0	0	0	978.8	566.4
18	0	0	0	0	0	1311.2	484
19	0	0	0	0	0	1310.4	496

X<sub>1</sub>: Flujo de aire (ml/h); X<sub>2</sub>: Suero dulce (g/L); X<sub>3</sub>: Extracto de levadura (g/L); X<sub>4</sub>: MgSO<sub>4</sub>/MnSO<sub>4</sub> (g/L); X<sub>5</sub>: Tween 80 (%); AM: Actividad antimicrobiana modificada 1 y 2.

**Cuadro 14.** Análisis de varianza (ANOVA) de las variables de respuesta modificadas  
AM1 y AM2

<b>Factor</b>	<b>Valor-p AM1</b>	<b>Valor-p AM2</b>
X4: MgSO <sub>4</sub> /MnSO <sub>4</sub>	0.8598	0.6296
X3: Extracto de levadura	0.1007	0.2096
X2: Suero dulce	0.1942	0.1338
X1: Flujo de aire	0.2968	0.4616
X5: Tween 80	0.2344	0.3500
X4X3	0.4185	0.4241
X4X2	0.4305	0.4690
X4X1	0.8164	0.6987
X4X5	0.7987	0.8924
X3X2	0.6590	0.9660
X3X1	0.0869	0.2196
X3X5	0.8259	0.6596
X2X1	0.9020	0.9525
X2X5	0.6147	0.7791
X1X5	0.8099	0.5518
R <sup>2</sup>	0.8747	0.8218